

**Tiago Luís Calretas Machado Dias**

Licenciatura em Biologia Marinha e Biotecnologia

**Estudo da biodiversidade em  
actinobactérias marinhas, provenientes de  
sedimentos oceânicos colhidos no  
Arquipélago da Madeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
Biotecnologia

Orientadora: Doutora Susana P. Gaudêncio  
Investigadora Auxiliar, REQUIMTE/CQFB – FCT/UNL

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Doutora Ilda Santos Sanches  
Prof<sup>a</sup>. Associada, CREM – FCT/UNL

Júri:

Presidente: Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Cecília Afonso Roque  
Arguente: Prof<sup>a</sup> Doutora Rosario Mato Labajos  
Vogal: Doutora Susana P. Gaudêncio

**Setembro, 2013**



Copyright © Tiago Luís Calretas Machado Dias, Faculdade de Ciências e Tecnologia,  
Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.



**A quem percorreu este caminho comigo.**



**O primeiro mandamento, que eu acho que é a coisa mais definitiva da  
ciência, diz: “Nunca tenha a certeza absoluta de nada”.**

**António Coutinho**





## **Agradecimentos:**

Tenho de começar por agradecer à Doutora Susana Gaudêncio por me ter aceite, “enquanto aluno”, neste projeto que me abriu horizontes no âmbito dos recursos marinhos.

Agradeço também à Prof<sup>a</sup> Doutora Ilda Sanches pela partilha de conhecimento, não só do seu conhecimento científico, mas também ao nível de organização e metodologias de trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Doutora Cecília M. Rodrigues do Centro de Patogénese Molecular da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa pela realização dos ensaios anticancerígenos.

À Doutora Florbela Pereira pela ajuda na realização do trabalho, pelos conselhos e opiniões em relação a esta dissertação.

Aos investigadores Paul Jensen e Chris Kauffman do Scripps Institution of Oceanography UC, San Diego, pela ajuda que deram neste trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Raquel Portela e Damian Costa pela paciência que tiveram em ensinar, por vezes o mais básico, mas quase sempre o mais elaborado. Especialmente à Raquel por despende o tempo que não tinha e o Damian pela forma pedagógica e humilde de partilhar o seu saber.

À Nicole Soares, obrigado por tudo e mais alguma coisa, definitivamente sem esta ajuda o projeto seria muito mais difícil de concretizar!

Quero agradecer aos meus colegas de curso e amigos, Cristiana Morais, Cláudia Fernandes, Inês Pedras, Marisa Silva e Tiago Monteiro por me terem apoiado durante este ano!

Agradecer ao Loïc de Carvalho, por me ter acompanhado todo este ano, a maior parte do tempo por telefone e aos amigos que me ajudaram a percorrer todo este caminho, muito especialmente a ti Susana, por me aturares e pelos conselhos que me deste.

Quero agradecer à minha mãe, por tudo o que me ensinou, pela maneira como me educou, por não me criar barreiras nas escolhas que fiz, escolhas que me trouxeram até aqui.

À Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT), Ministério da Educação e Ciência, pelo financiamento do projeto de I&D ref. PTDC/QUI-QUI/119116/2010 designado “Tesouros Oceânicos - Sedimentos oceânicos do Arquipélago da Madeira: nova fonte de compostos inovativos e bioactivos”, que inclui o tema da presente Dissertação, o projeto estratégico ref. PEst-OE/BIA/ UI0457/2011-CREM (Centro de Recursos Microbiológicos) e Sétimo Programa Quadro da União Europeia (FP7/2007-2013) sob o acordo n.º PCOFUND-GA-2009-246542.



## Resumo

As bactérias marinhas são um recurso importante e pouco explorado na descoberta de novos fármacos. Neste trabalho foram isoladas 333 estirpes morfológicamente semelhantes a actinomicetas ou actinobactérias, a partir de 662 amostras de sedimentos marinhos, recolhidas no arquipélago da Madeira.

Para estudar a biodiversidade de actinomicetas e para avaliar a sua capacidade de produção de compostos bioativos, foram consideradas para este estudo 131 das estirpes isoladas, das quais 82 estirpes foram identificadas através da sequenciação do gene 16S rRNA. Observou-se que destas estirpes 75 (91%) são actinomicetas, sendo os géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Salinispora* predominantes, representando 81% dos actinomicetas.

Com este trabalho foi possível verificar a ocorrência de espécies raras do género *Salinispora*, nomeadamente, *S. arenicola* e *S. pacifica*.

Observou-se a existência de tipos diferentes de *S. pacifica*, o que sugere uma divergência filogenética dentro da espécie e consequentemente, a possibilidade de produzirem novos metabolitos secundários, com diferentes atividades biológicas.

Para avaliar a produção de compostos bioativos das estirpes foram produzidos extratos químicos, utilizando um solvente orgânico. Posteriormente, avaliou-se a atividade antimicrobiana dos extratos em estirpes de origem clínica *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA), *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina (VRE) e uma estirpe de referência *Candida albicans*, e avaliou-se a capacidade citotóxica em linhas celulares HCT-116. No total foram avaliados 126 extratos, dos quais cinco apresentaram atividade antibacteriana com valores de MIC entre  $1,3 \times 10^{-1}$  e  $7,8 \times 10^{-3}$  µg/µl e seis apresentaram atividade citotóxica com valores de IC50 entre 4,9 e 19,66 µg/ml.

Destes extratos, dois apresentaram diversidade bioativa, com atividade antimicrobiana e atividade citotóxica e foram obtidos de estirpes identificadas como pertencentes ao género *Micromonospora* e ao género *Salinispora*.

Estes resultados, tão promissores, são um incentivo para futuros estudos de determinação estrutural e descoberta de novos compostos bioativos para potenciais fármacos.

**Palavras-chave:** Actinomicetas marinhos, *Salinispora*, biodiversidade, antimicrobianos, anticancerígenos, metabolitos secundários.



## Abstract

The marine bacteria are an important and unexplored resource for drug discovery. In this work 333 strains morphologically similar to actinomycetes were isolated, from 662 samples of marine sediments collected in Madeira Archipelago.

To study the biodiversity of actinomycetes and to evaluate their capacity to produce bioactive compounds, 131 strains were considered for this work where 82 of those were identified by sequencing of the 16S rRNA gene. It was observed that, 75 strains (91%) are actinomycetes; the genera *Streptomyces*, *Micromonospora* and *Salinispora* were predominant, representing 81% of the actinomycetes.

With this work it was verified the occurrence of the genus *Salinispora*, including the species *S. arenicola* and *S. pacifica*.

It was also verified the existence of different types of *S. pacifica*, suggesting phylogenetic divergence within the species and this may signify the potential isolation of new secondary metabolites with different biological activities

To evaluate the production of bioactive compounds of these strains, a chemical extracts were obtained using an organic solvent. The next step was the evaluation of antimicrobial activity of the extracts against strains of clinical origin, the methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), the vancomycin resistant *Enterococcus faecium* (VRE) and a reference strain of *Candida albicans*, in addition cytotoxic activity in cell lines HCT-116 was evaluated.

In total 126 extracts were evaluated and five of them showed antibacterial activity with MIC values between  $1.3 \times 10^{-1}$  and  $7.8 \times 10^{-3}$   $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  and six showed cytotoxic activity with IC50 values between 4.9 and 19.66  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Two of those extracts showed bioactive diversity, with antimicrobial and cytotoxic activity. These extracts were obtained from strains identified with the genera *Micromonospora* and *Salinispora*.

The results obtained in this work report some promising future for studies of structural determination and discovery of new bioactive compounds for potential drugs.

**Keywords:** marine actinomycetes, *Salinispora*, biodiversity, antimicrobial, anticancer, secondary metabolites.



## Índice de matérias

1	Introdução .....	3
1.1	Actinomicetas em ambientes marinhos .....	4
1.2	O papel ecológico de actinobactérias no meio marinho .....	4
1.3	Actinomicetas raros e isolamento seletivo.....	5
1.4	Abordagens moleculares para identificar actinomicetas marinhos .....	8
1.4.1	Abordagens experimentais não dependentes de culturas microbianas .....	8
1.4.2	Metagenómica .....	9
1.5	Processo de fermentação de produtos metabólicos.....	9
1.6	Metabolismo secundário de actinomicetas .....	11
1.6.1	Novos metabolitos de actinomicetas marinhos.....	11
1.7	Género <i>Salinispora</i> .....	13
1.7.1	Distribuição geográfica de <i>Salinispora</i> sp.....	13
1.7.2	Metabolitos secundários de <i>Salinispora</i> sp.....	14
1.8	Contextualização do trabalho e objetivos .....	17
2	Materiais e Métodos .....	21
	Recolha de amostras de sedimentos marinhos.....	22
2.1	Isolamento e purificação de actinomicetas .....	23
2.2	Rastreio de colónias semelhantes a <i>Salinispora</i> sp.....	23
2.3	Propagação das estirpes em meio A1 líquido .....	24
2.4	Criopreservação.....	24
2.5	Critério de seleção das estirpes para os estudos de biodiversidade e potencial biotecnológico.....	24
2.6	Produção de extratos químicos .....	24
2.7	Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos químicos (crudes) .....	25
2.8	Determinação da atividade citotóxica dos extratos químicos (crudes) .....	27
2.9	Extração de DNA para amplificação do gene 16S rRNA.....	27
2.10	Amplificação do gene 16S rRNA por PCR .....	28
2.11	Purificação do produto de PCR .....	29
2.12	Sequenciação do gene 16S rRNA.....	29
2.13	Identificação taxonómica e análise filogenética .....	30
	Meios de cultura, Soluções e Tampões.....	31
3	Resultados .....	37
3.1	Isolamento de colónias morfologicamente semelhantes a actinomicetas .....	37
3.2	Rastreio de colónias morfologicamente semelhantes ao género <i>Salinispora</i> .....	39
3.3	Identificação taxonómica das estirpes com base na sequenciação do gene 16S rRNA. ....	40
3.3.1	Género <i>Streptomyces</i> .....	41
3.3.2	Género <i>Micromonospora</i> .....	41
3.3.3	Género <i>Salinispora</i> .....	42
3.3.4	Outros géneros.....	43
3.4	Análise filogenética de estirpes com identidade máxima com o género <i>Salinispora</i> .....	43
3.5	Avaliação do potencial biotecnológico dos extratos químicos (crudes) .....	47

3.5.1 Avaliação da capacidade inibitória microbiana dos crudes .....	47
3.5.2 Avaliação da capacidade citotóxica dos crudes .....	47
4 Discussão.....	55
4.1 Isolamento de colónias morfológicamente semelhantes a actinomicetas .....	55
4.2 Rastreio de colónias morfológicamente semelhantes ao género <i>Salinispora</i> .....	55
4.3 Identificação taxonómica das estirpes a partir da sequenciação do gene 16S rRNA. ....	55
4.4 Análise filogenética de estirpes com identidade máxima com o género <i>Salinispora</i> .....	56
4.5 Avaliação do potencial biotecnológico dos extratos químicos (crudes) .....	58
4.5.1 Avaliação da capacidade inibitória microbiana dos crudes .....	58
4.5.2 Avaliação da capacidade citotóxica dos crudes .....	59
5 Conclusão e perspectivas futuras .....	63
Referências Bibliográficas .....	67
Anexos.....	73



**Índice de figuras**

Figura 1. 1. .... 14

Figura 1. 2. .... 15

Figura 1. 3. .... 16

Figura 1. 4. .... 16

Figura 2. 1. .... 21

Figura 2. 2. .... 22

Figura 2. 3. .... 23

Figura 2. 4. .... 26

Figura 2. 5. .... 29

Figura 3. 1. .... 38

Figura 3. 2. .... 38

Figura 3. 3. .... 39

Figura 3. 4. .... 41

Figura 3. 5. .... 44

Figura 3. 6. .... 46



## Índice de tabelas

Tabela 1. 1.....	7
Tabela 1. 2.....	12
Tabela 3. 1.....	43
Tabela 3. 2.....	48
Tabela 3. 3.....	49
Anexo 1. 1.....	73



## Lista de abreviaturas

**G** - guanina

**C** - citosina

**HCT-116** – linha celular de carcinoma do colon humano

**IC50** – medida da concentração de inibição de metade da população

**Cyc** – ciclohexamida

**A1DI** – meio de cultura A1 com água bidestilada

**YM**- meio de cultura seletivo para leveduras

**BHI**- brain heart infusion

**DMSO**- dimetil sulfóxido

**EDTA** - ácido etilenodiamino tetra-acético

**MRSA**- *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina

**VRE**- *Enterococcus* resistente a vancomicina

**ml** - mililitro

**µl** - microlitro

**nm**- nanómetro

**°C**- grau centígrado

**rpm** - rotações por minuto

**DO** - densidade ótica

**UV** - ultra violeta

**VIS** - visível

**MIC**- Minimum Inhibitory Concentration

**MTS** - 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -5- (3-carboximetoxifenil) - 2- (4-sulfofenil) -2H-tetrazolium, com sal.

**DNA**- ácido desoxirribonucleico (ADN em português)

**RNA** - ácido ribonucleico (ARN em português)

**rRNA** - RNA ribossomal

**PCR** - *polymerase chain reaction*

**pb** - pares de bases

**NCBI** - *National Center for Biotechnology Information*

**BLAST** - *Basic Local Alignment Search Tool*

**NJ** - *neighbour-joining*



## Capítulo 1. Introdução







## 1 Introdução

A classe *Actinobacteria* é caracterizada por bactérias gram-positivas com um elevado conteúdo de G+C no DNA. Nesta classe insere-se a ordem *Actinomycetales* conhecida por actinomicetas ou actinobactérias.

Os actinomicetas são muito abundantes nos solos terrestres, sendo conhecidos pela sua capacidade de produzir metabolitos secundários com importância na indústria farmacêutica, nomeadamente, antibióticos como a actinomicina, aminoglicosídeos, cloranfenicol,  $\beta$ -lactâmicos, macrolídeos e tetraciclina. Na década de 80, cerca de 70% dos antibióticos naturais conhecidos eram provenientes destes microrganismos. Atualmente são contabilizados aproximadamente 10.000 compostos [1], [2].

Embora a exploração destes microrganismos, outrora, parecesse promissora, tem-se observado nas últimas décadas um decréscimo na descoberta de novos compostos provenientes de actinomicetas terrestres, devido a uma exaustão dos estudos destes recursos [1]. Assim, tornou-se necessário desenvolver novas estratégias e explorar novos actinomicetas, derivados de outros ecossistemas, na busca de uma nova geração de antibióticos [3].

Estima-se que os oceanos, juntamente com os mares, cobrem mais de 70% da superfície do planeta, comportando uma diversidade biológica fenomenal, estima-se que em alguns ecossistemas, como os fundos oceânicos e recifes de coral, a diversidade biológica chega a ser superior à das florestas tropicais [4].

Sendo as condições ambientais do mar extremamente diferentes das condições terrestres é natural presumir que os actinomicetas marinhos possam ter características diferentes dos terrestres, bem como produzir novos compostos bioativos. Estes actinomicetas tiveram que se adaptar a condições extremas durante o processo evolutivo, tais como altas pressões (~1100 atmosferas), condições anaeróbias a temperaturas inferiores a 0°C, condições ácidas com pH a 2.8 ou temperaturas superiores a 100°C nas fontes hidrotermais [4].

Neste contexto os fundos oceânicos têm sido considerados como um ecossistema para muitos actinomicetas ainda não identificados [5], [6], [7]. Alguns destes actinomicetas necessitam de água do mar para o seu crescimento, mais especificamente de cloreto de sódio [2], [8]. Esta característica foi primeiramente observada no género designado por MAR 1, isolada de sedimentos marinhos sendo mais tarde proposta para o género *Salinispora* [8].

Este tipo único de adaptação, dos actinomicetas ao ambiente marinho constitui uma fonte promissora de investigação para novos tipos de compostos bioativos [6].

## 1.1 Actinomicetas em ambientes marinhos

Embora os oceanos contenham uma área geográfica extensa, o conhecimento sobre a sua diversidade microbiana é reduzido. Existe uma hipótese, que coloca a possibilidade dos actinomicetas marinhos de zonas costeiras, terem sido originados de esporos de actinomicetas terrestre com tolerância ao sal. Contudo o isolamento de estirpes de sedimentos marinhos recolhidos a grandes profundidades afasta a hipótese de uma origem terrestre [9].

No total da superfície do mar, apenas 7-8% é zona costeira, sendo o restante mar profundo, do qual 60% é coberto por água a mais de 2000 metros de profundidade. O fundo do mar é um ambiente único e extremo caracterizado por altas pressões, baixas temperaturas, com falta de luminosidade e de concentração de oxigénio [3], [10].

Devido a estas diferenças ambientais, é normal que tenham ocorrido divergências filogenéticas nos actinomicetas marinhos em relação aos terrestres, consequentemente na produção de metabolitos secundários, com estruturas e atividades diferentes dos terrestres [2].

Estudos recentes comprovam a existência de actinomicetas nativos do oceano. Estes incluem membros dos géneros *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Dietzia*, *Prauserella*, *Serinicoccus*, *Marinophilus*, *Solwaraspora*, *Lamerjespora*, *Aeromicrobium*, *Williamsia*, *Marinactinospora* e *Sciscionella* [11].

Para além dos já referidos, foram, recentemente, descritos outros géneros como *Salinispora* [5], [12], [13] e *Marinospora* [5], ficando documentado que ambos os géneros necessitam de água do mar para o seu crescimento, bem como a estirpe *Aeromicrobium marinum* [14] que também tem uma necessidade obrigatória NaCl.

A estirpe *Verrucosispora* AB-18-032, recentemente descrita também é qualificada como sendo nativa do mar [15]. Outro género recentemente caracterizado é o *Salinobacterium*, que tolera valores de NaCl superiores a 10%, mas não tem a necessidade do sal para o crescimento [16].

Alguns dos actinomicetas referidos demonstram a capacidade de produzir compostos únicos, como as salinosporamidas, que se encontram em fase III de ensaios clínicos como agentes anticancerígenos potentes [2], [5], [6], [17].

## 1.2 O papel ecológico de actinobactérias no meio marinho

Além da produção de antibióticos, os actinomicetas têm também um papel importante no ambiente marinho. A degradação e a transformação de vários materiais são um processo mediado pela ação de vários microrganismos [10].

Foram reportados casos de actinomicetas de fontes marinhas com capacidades de decomposição de agar, alginato, laminarina, celulose, quitina, petróleo e outros hidrocarbonetos. Foram também implícitos na decomposição de madeira submersa no mar. Os géneros

*Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium* e *Nocardia* foram inseridos no grupo de microrganismos importantes na degradação de petróleo, em habitats aquáticos, tendo mesmo a capacidade de crescer em tanques de combustível [18].

Foram também reportados actinomicetas marinhos com atividade celulolítica, quitinolítica, produtores de enzimas industriais importantes como *Streptomyces fungicidicus* MML1614, produtor de proteínas alcalinas termoestáveis. Existe uma especulação no meio científico, que o aumento e o decréscimo de microrganismos produtores de enzimas particulares, podem indicar a concentração de substrato natural e condições do ambiente [10], [19].

Adicionalmente, desempenham um papel significativo na mineralização de matéria orgânica, imobilização de nutrientes minerais, fixação de azoto, no melhoramento dos parâmetros físicos e na proteção ambiental [4], [18].

Embora o papel ecológico destes microrganismos continue por definir, é possível que, tal como os actinomicetas terrestres, estejam envolvidos na decomposição de materiais orgânicos recalcitrantes como a quitina, que é um biopolímero abundante no oceano.

Avaliar o papel ecológico destes microrganismos é essencial, não só para compreender o seu potencial biotecnológico na produção de metabolitos secundários e, consequentemente, na descoberta de novos compostos com interesse farmacêutico ou industrial, entre outros, mas também para valorizar o seu potencial de biorremediação devido à sua capacidade de degradar compostos contaminantes.

### **1.3 Actinomicetas raros e isolamento seletivo**

Presentemente existe um contraste enorme entre a baixa ocorrência de actinomicetas raros e a diversidade de espécies de *Streptomyces*, este contraste deve-se ao facto destes serem difíceis de isolar do ambiente, propagar e manter em condições convencionais [20], [21]. Assume-se assim, que é necessário usar procedimentos apropriados de isolamento e de aplicar uma variedade de métodos de seleção diferentes, para cada grupo taxonómico de actinomicetas [9], [21].

É possível isolar actinomicetas raros tendo em conta vários fatores durante o processo de isolamento, tais como a seleção dos habitats onde são recolhidas as amostras, pré-tratamento físico e químico das amostras, utilização de meio de cultura específico e seletivo, equilíbrio entre condições de cultura e metodologias específicas para cada género de actinomicetas [21].

Foi observado, noutros trabalhos, que o número relativo de isolamentos de actinomicetas do género *Micromonospora* e *Streptomyces* dependia da profundidade a que as amostras de sedimento tinham sido recolhidas, pois o número de *Micromonospora* aumenta com a profundidade, enquanto o oposto acontece com o número de *Streptomyces*. Esta observação

aponta para que o conhecimento logístico dos locais de amostragem é extremamente importante para o isolamento de actinomicetas [9].

Em relação ao pré-tratamento físico e químico das amostras e a utilização de meio de cultura específico e seletivo, foram compiladas metodologias de vários autores visíveis na tabela 1.1[22].

Foi também descrito que diferentes tipos de radiação favorecem o isolamento seletivo de diferentes géneros de actinomicetas. Por exemplo *super high frequency* (SHF), a radiação com estas frequências permite o isolamento eficiente de *Streptosporangium* e *Rhodococcus*, *extremely high frequency* (EHF) favorece o isolamento de *Nocardiopsis*, *Nocardia* e *Streptosporangium* sp. e a radiação ultra violeta (UV) foi eficiente no isolamento de *Nocardiopsis*, *Nocardia* e *Pseudonocardia* sp. [9].

**Tabela 1. 1**– Compilação de métodos desenvolvidos para o isolamento de actinomicetas raros no período 1987-2007 (tabela adaptada de Hayakawa, 2008).

Pretreatment	Culture media	Genera selected
<u>Physical:</u>		
None	HV agar with or without nalidixic acid and trimethoprim	<i>Streptomyces</i> and other genera
Dry heat at 120 °C for 1 h	HV agar with nalidixic acid	Many rare actinomycete genera including <i>Spirilliplanes</i>
<u>Chemical:</u>		
SDS 0.05% and Yeast extract 5%	HV agar with nalidixic acid	<i>Streptomyces</i> and other genera
Phenol 1.5%	HV agar with nalidixic acid and tunicamycin	<i>Micromonospora</i>
Phenol 1.5%	HV agar	<i>Streptomyces violaceusniger</i> cluster
Chloramine-T	HV agar with nalidixic acid	<i>Herbidospora</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Microtetraspora</i> , <i>Nonomuraea</i> and <i>Streptosporangium</i>
<u>Physical and chemical:</u>		
Dry heat at 110 °C for 1 h and phenol 1.0%	HV agar with kanamycin, josamycin, lysozyme and nalidixic acid	<i>Actinomadura viridis</i>
Dry heat at 120 °C for 1 h and phenol 1.5%-CG 0.01%	HV agar with nalidixic acid	<i>Microbispora</i>
Dry heat at 120 °C for 1 h and BC 0.01% (or 0.03%)	HV agar with nalidixic acid and leucomycin (or tunicamycin)	<i>Streptosporangium</i> or <i>Dactylosporangium</i>
Dry heat at 110 °C for 1 h and BC 0.05%	LSV-SE agar with kanamycin, nalidixic acid and norfloxacin	<i>Microtetraspora</i>
<u>Enrichment:</u>		
Chemotaxis ( $\gamma$ -collidine, vanillin)	HV agar with nalidixic acid	<i>Actinoplanes</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Virgosporangium</i>
<u>Enrichment and physical:</u>		
Pollen-baiting and drying	HV agar with nalidixic acid	<i>Actinoplanes</i>
Rehydration (30 °C, 90 min) and centrifugation (1,500 × g, 20 min)	HV agar with nalidixic acid and trimethoprim	<i>Actinoplanes</i> , <i>Actinokineospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Catenuloplanes</i> , <i>Cryptosporangium</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Geodermatophilus</i> , <i>Kineospora</i> , <i>Sporichthya</i>
CaCO <sub>3</sub> , rehydration and centrifugation	HV agar with fradiomycin, kanamycin, nalidixic acid and trimethoprim	<i>Actinokineospora</i>
Sucrose-gradient centrifugation (240 × g, 30 min)	HV agar with nalidixic acid and chlortetracycline	<i>Nocardia</i>
Moist incubation and drying	HV agar with nalidixic acid and trimethoprim	<i>Streptomyces</i> and other genera

\*CG - glutamato de clorexidina; BC – cloreto de benzetônio; HV – ácido húmico-vitaminas

O uso de meio de cultura com água do mar, favorece o isolamento de actinomicetas marinhos obrigatórios como o primeiro género descrito, *Salinispora*, o género *Marinospora* ou a estirpe *Aeromicrobium marinum* [8],[14].

Novas técnicas avançadas de isolamento incluem [11]:

- Procedimentos de enriquecimento únicos
- Pré-tratamento das amostras com etanol 70%
- Métodos de isolamento seletivo
- Construção de bibliotecas genómicas ambientais
- Uso de meio seletivo e análise filogenética
- Métodos de cultura não dependentes de culturas microbianas
- Análise de imagens digitais

A aplicação de vários métodos de isolamento seletivo resulta assim na cultura bem sucedida de diversos grupos de actinomicetas, a partir de um número limitado de amostras de sedimento [9].

#### **1.4 Abordagens moleculares para identificar actinomicetas marinhos**

O maior desafio nos estudos de biodiversidade microbiana em habitats marinhos é a acessibilidade dos seus microrganismos. É agora aceite que menos de 1% dos microrganismos podem ser isolados usando técnicas de cultura tradicionais, deixando o resto dos microrganismos e os seus percursos metabólicos inacessíveis [23].

O número de estirpes bacterianas não cultiváveis, que produzem metabolitos secundários, tem limitado o acesso a grandes diversidades genéticas relacionadas com recursos químicos inexplorados para a terapêutica e outras aplicações industriais [6], [24].

A emergência das técnicas não dependentes de culturas e da metagenómica têm contudo providenciado ferramentas para determinar a extensão total da diversidade microbiana não cultivável, permitindo o acesso aos percursos metabólicos destes microrganismos [23].

##### **1.4.1 Abordagens experimentais não dependentes de culturas microbianas**

Estas abordagens envolvem a extração de DNA presente em amostras ambientais sem a necessidade de isolamento dos microrganismos, seguido da amplificação do gene 16S rRNA por PCR e subsequentemente, a utilização de técnicas baseadas em polimorfismos *fingerprinting* como *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), terminal-RFLP (T-RFLP), *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE) e *thermal -GGE* (TGGE) [12], [26], [27]. Através destas

técnicas é possível distinguir fragmentos diferentes, sendo possível a separação dos produtos heterogêneos que são sequenciados e classificados quanto à sua taxonomia.

A utilização de *primers* seletivos mostrou ser uma ferramenta útil nestas tipo de abordagens. Foram desenhados conjuntos de *primers* seletivos para a amplificação por PCR do gene 16S rRNA de famílias de *Actinomycetales* como *Micromonosporaceae*, *Streptomycetaceae*, *Streptosporangiaceae* e *Thermomonosporaceae*, e do gênero *Dactylosporangium*. A amplificação do gene 16S rRNA de amostras ambientais com estes *primers*, mostra a frequência da ocorrência destes grupos e também revela sequências, que podem ser atribuídas a novos grupos de actinomicetas [25]. A presença de actinomicetas nativos de ambientes marinhos foi confirmada, por estudos com este tipo de abordagens moleculares [12].

### 1.4.2 Metagenômica

A metagenômica é definida como o estudo do genoma coletivo, agrupado em amostras ambientais, e a sua análise pode ser dirigida tanto sequencialmente como funcionalmente [23].

Avanços conceituais e tecnológicos recentes têm permitido o aumento do uso da investigação metagenômica de ambientes marinhos. Avanços de tecnologias de sequenciação e redução de custos destas tecnologias têm tornado a sequenciação aleatória de DNA ambiental economicamente acessível [23].

A sequenciação “*shotgun*” e a pirosequenciação são exemplos de tecnologias usadas na clonagem e sequenciação de DNA microbiano de ambientes marinhos, sendo a primeira a mais utilizada na maioria das investigações metagenômicas.

A sequenciação *shotgun* permite contextualizar na totalidade qualquer gene detectado, dando maior probabilidade de reconstruir os percursos metabólicos de membros individuais de um consórcio particular de microrganismos marinhos. Por outro lado a pirosequenciação que envolve uma nova forma de sequenciação, por tecnologias de síntese, está agora a ser explorada como metodologia custo/efeito que pode ser empregue em análises metagenômicas [23].

Não existe uma ferramenta única que permita o acesso definitivo à diversidade de actinomicetas. Por isso o uso de abordagens multidisciplinares envolvendo uma combinação de técnicas de biologia molecular, métodos de microbiologia, técnicas geoquímicas ou microsensores são necessárias para obter um melhor panorama das actinomicetas em ambientes marinhos [11].

## 1.5 Processo de fermentação de produtos metabólicos

Vários autores acreditam que, com a otimização das condições de fermentação, é possível aumentar a produção de metabolitos secundários [29], [30].

A produção de metabolitos secundários nos actinomicetas é muito influenciada por vários parâmetros fermentativos tais como a disponibilidade de nutrientes, pH, pressão parcial de oxigénio ( $pO_2$ ), temperatura, agitação, sais minerais, iões metálicos, percussores, indutores e inibidores, que muitas vezes variam de organismo em organismo [29], [30].

A síntese de metabolitos secundários têm início quando o crescimento celular abranda ou pára [31], portanto a produção dos metabolitos secundários pode ser reprimida pela disponibilidade de fontes de carbono, azoto em abundancia ou elevados níveis de fósforo, contribuindo todos para a manutenção da atividade de crescimento das actinomicetas [30].

Na fase exponencial de propagação de uma cultura bacteriana, num sistema *batch*, o crescimento microbiano é intensivo e a produção de metabolitos secundários é lenta. A fase de transição é a fase em que o crescimento e a produção de proteínas decrescem, dando lugar à síntese das enzimas dos metabolitos secundários, iniciando assim a sua produção. Na fase de produção, o crescimento decresce e a produção de metabolitos secundários é superior [31].

Os actinomicetas que produzem metabolitos secundários, por vezes têm o potencial de produzir vários compostos a partir de uma única estirpe [30].

Foi investigada noutros trabalhos, a alteração sistemática de parâmetros relacionados com os meios de cultura de fácil quantificação como a composição do meio, arejamento, adição de inibidores enzimáticos. Tudo para o aumento do número de metabolitos secundários disponíveis de uma única fonte microbiana [30].

Foi denominado por abordagem *one strain many compounds* (OSMAC) a esta maneira de revelar a diversidade natural química. O uso desta abordagem permitiu o isolamento de mais de 20 metabolitos diferentes com um rendimento acima de 2,6 g/l de um único organismo. Esta abordagem oferece uma boa alternativa para as indústrias de rastreio de alto rendimento que se focam nos princípios ativos de ensaios biológicos distintos [30].

Apesar dos exemplos bem conhecidos sobre a indução de uma biossíntese selecionada (ex. por aumento ou decréscimo de fósforo no meio de cultura), não existe uma visão global sobre o potencial nesta área, para descobrir novos produtos naturais, sugerindo uma possibilidade interessante de investigação [11].

No contexto da descoberta de novos metabolitos secundários, de origem marinha, torna-se necessário a investigação dos processos de regulação fermentativa, bem como os tempos de ocorrência das fases de crescimento e de produção de metabolitos secundários, podendo assim rentabilizar-se o potencial biotecnológico destas bactérias marinhas.



## 1.6 Metabolismo secundário de actinomicetas

Desde a descoberta da penicilina em 1929 cerca de 50.000 produtos naturais foram descobertos de microrganismos e cerca de 22.500 são bioativos. Entre estes, menos de 1% são utilizados clinicamente em humanos e animais, bem como na agricultura [20].

Entre os metabolitos microbianos presentemente conhecidos, 45% (~10.000 compostos) foram isolados de vários actinomicetas. Destes compostos, 75% foram isolados de *Streptomyces* e 25% de actinomicetas raros [20].

A representação de metabolitos de actinomicetas raros nos anos 70 era apenas de 5% contudo, os géneros *Micromonospora*, *Actinomadura*, *Streptoverticillium*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Saccharopolyspora* e *Streptosporangium* sp. estão a aumentar a produção de metabolitos com grande espectro antimicrobiano e antibióticos. Os actinomicetas raros produzem vários compostos, únicos, sem precedentes, muitas vezes complexos e complicados, que exibem um grande potencial bioativo e normalmente com baixa toxicidade [20].

Várias substâncias antimicrobianas de actinomicetas foram isoladas e caracterizadas, incluindo aminoglicosídeos, antraciclinas, glicopeptídeos,  $\beta$ -lactâmicos, macrólidos, nucleosídeos, peptídeos, polienes, poliésteres, policetídeos, actinomicinas e tetraciclinas.

A maioria dos metabolitos são normalmente excretados para o meio de cultura e têm sido utilizados como várias drogas, como herbicidas, agentes anticancerígenos e agentes antiparasitários [11].

Com o conhecimento aqui referido, o potencial de espécies mais comuns de *Streptomyces* não deve ser menosprezado. Os *Streptomyces* de origem marinha têm sido demonstrados quanto à sua capacidade de sintetizar compostos antibacterianos, antifúngicos, inseticidas, anti-tumorais, anti-inflamatórios, agentes antiparasitários, antivirais, “*antifouling*”, desinfetantes e inibidores enzimáticos. Estas características tornam este género um assunto importante de investigação, tanto do ponto de vista académico, como industrial [11].

A sua capacidade de produzir novos compostos não será certamente ultrapassada num futuro próximo e continuam a ser responsáveis por produzir a maioria dos antibióticos clinicamente aplicados [20].

### 1.6.1 Novos metabolitos de actinomicetas marinhos

Embora mais de 30.000 doenças terem sido clinicamente descritas, menos de um terço podem ser sintomaticamente tratadas e poucas podem ser curadas. Um dos principais problemas no combate contra as doenças infecciosas é a resistência a drogas antimicrobianas. Neste sentido e como já foi referido anteriormente, é importante descobrir novos compostos bioativos [11][32].

Apesar da exploração de actinomicetas marinhos, como fonte de novos metabolitos secundários, estar numa fase embrionária, têm sido reportados nos últimos anos inúmeros metabolitos novos, como se pode observar na tabela 1.2. Esta lista representa o trabalho de investigação, de metabolitos secundários novos, produzidos por actinomicetas marinhos durante um período de cinco anos, que ilustra a quantidade de estruturas diferentes com atividade biológica [11].

Entre elas, alguns compostos como a staurosporinona, salinosporamida A, arenimicina, marinomicinas e proximicinas são particularmente interessantes devido à sua raridade, potência e diversidade bioativa. A lodopiridona é outro destes exemplos, trata-se de um alcaloide único produzido por *Saccharomonospora* sp., isolada de sedimentos marinhos e possui atividade contra a linha celular HCT-116 (carcinoma do colon humano) com valores de IC<sub>50</sub> de 3,6 µM [11].

**Tabela 1. 2–** Novos Metabolitos produzidos por actinomicetas marinhos durante o período de 2005-2010 (adaptado de Subramani e Aalbersberg 2012).

Compound	Source	Biological activity
Chinikomycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Anticancer
Chloro-dihydroquinones	Novel actinomycete	Antibacterial; anticancer
Glaciapyrroles	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Frigocyclinone	<i>Streptomyces griseus</i>	Antibacterial
Lajollamycin	<i>Streptomyces nodosus</i>	Antibacterial
Mechercharmucins	<i>Thermoactinomyces</i> sp.	Anticancer
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	Anticancer; antimalarial
Sporolide A	<i>Salinispora tropica</i>	Unknown
Salinosporamides B & C	<i>Salinispora tropica</i>	Cytotoxicity
2-Allyloxyphenol	<i>Streptomyces</i> sp.	Antimicrobial; food preservative; oral disinfectant
Saliniketal	<i>Salinispora arenicola</i>	Cancer chemoprevention
Marinomycins A-D	<i>Marinispora</i>	Antimicrobial; anticancer
Cyanosporaside A	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown
Lodopyridone	<i>Saccharomonospora</i> sp.	Anticancer
Arenimycin	<i>Salinispora arenicola</i>	Antibacterial; anticancer
Salinispyrone	<i>Salinispora pacifica</i>	Unknown
Salinipyrones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Mild cytotoxicity
Pacificanones A & B	<i>Salinispora pacifica</i>	Antibacterial
Arenicolides A-C	<i>Salinispora arenicola</i>	Mild cytotoxicity
1-hydroxy-1-norresistomycin	<i>Streptomyces chinaensis</i>	Antibacterial; anticancer
Resistoflavin methyl ether	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anti-oxidative
Staurosporinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor; phycotoxicity
Sesquiterpene	<i>Streptomyces</i> sp.	Unknown
1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor
Caboxamycin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial; anticancer
Butenolides	<i>Streptoverticillium luteovorticillatum</i>	Antitumor
Daryamides	<i>Streptomyces</i> sp.	Antifungal; anticancer
Plericidins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor
Proximicins	<i>Verrucosisspora</i> sp.	Antibacterial; anticancer
Streptokordin	<i>Streptomyces</i> sp.	Antitumor
ZHD-0501	<i>Actinomadura</i> sp.	Anticancer
Bisanthraquinone	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial
Tirandamycins	<i>Streptomyces</i> sp.	Antibacterial

## 1.7 Género *Salinispora*

O género *Salinispora* foi reportado por Mincer et al. (2002) sendo inicialmente chamado de MAR 1 e representa o primeiro grupo de actinomicetas marinhos.

Este grupo é descrito como sendo aeróbio, gram-positivo, formando hifas muito ramificadas no substrato e possuindo esporos lisos na superfície. Necessita de água do mar ou meio com suplemento de sódio para crescer, sendo visíveis em cultura entre 3-6 semanas, com uma temperatura entre os 10-30°C e pH entre 7-12 [8].

É reconhecido pela ausência de hifas aéreas, e pela pigmentação, que vai de laranja pálido ao preto. Produz frequentemente pigmentos difusíveis no substrato que podem ir do castanho-escuro ao preto, laranja brilhante ou rosa [8].

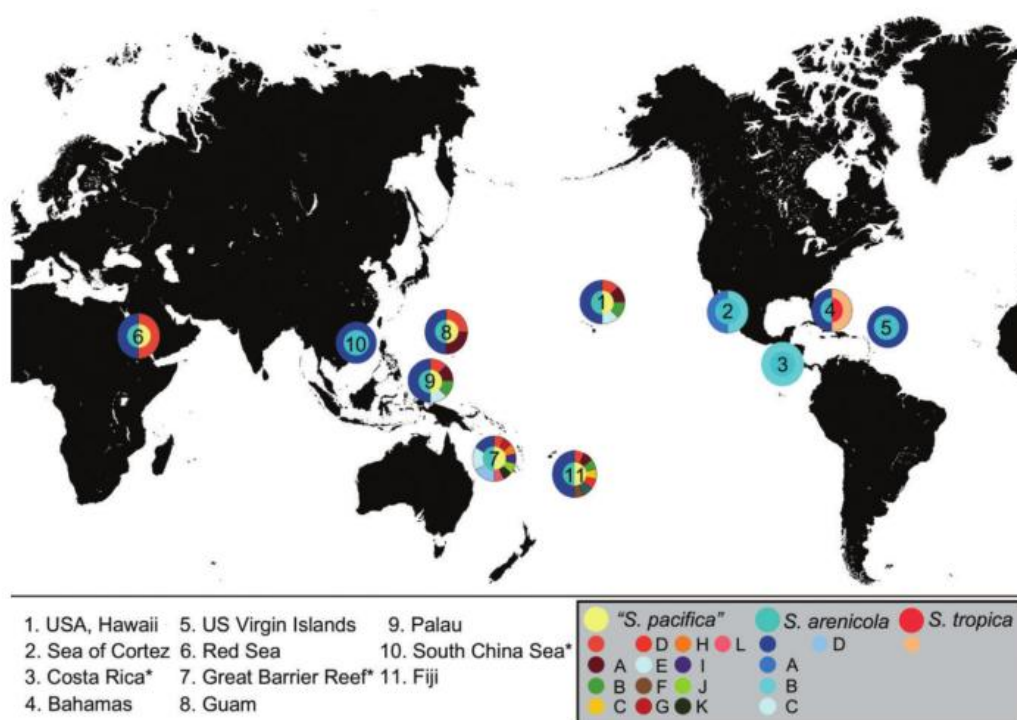
Atualmente são reconhecidas três espécies distintas pertencentes a este género *S. arenicola* e *S. tropica* formalmente descritos [8] e *S. pacifica* [7]

### 1.7.1 Distribuição geográfica de *Salinispora* sp.

Este género de actinomicetas marinhos distribui-se amplamente em sedimentos marinhos de áreas costeiras em zonas tropicais e subtropicais de todo o globo (distribuição pantropical) sendo também isoladas de esponjas do mar [33].

Em estudos recentes [33] foram indicados vários pontos de onde foram isoladas estirpes de *Salinispora* sp., com base no estudo dos tipos de sequências do gene 16S rRNA (Figura 1.1). Neste estudo foram incluídos os locais de isolamento de *Salinispora* sp. realizados pelo grupo de investigação da Universidade da Califórnia, San Diego, CA, USA (Scripps Institution of Oceanography, Center for Marine Biotechnology and Biomedicine) e locais de isolamentos realizados por grupos independentes com dados de sequências depositadas no GenBank.

Em detalhe, foram isoladas estirpes de *Salinispora* sp. em 11 locais, Havai, Mar Cortez, Costa Rica (costa do Pacífico), Bahamas, Ilhas Virgens (US), Mar Vermelho, Ilha de Guam, Ilha de Palau, Ilhas Fiji, Grande Barreira de Coral (Austrália) e Mar do Sul da China, sendo os dois últimos de dados depositados no GenBank. De uma forma geral estirpes de *S. arenicola* foram isoladas em todos os locais referidos, enquanto que estirpes de *S. pacifica* foram isoladas em vários locais do Pacífico exceto no Mar do Sul da China, Mar Cortez e Costa Rica. *S. pacifica* foi também isolada no Mar Vermelho. Quanto a estirpes de *S. tropica* foram isoladas apenas nas Bahamas.



**Figura 1. 1**– Mapa de distribuição de alelos de sequências do gene 16S rRNA de *Salinispora* sp. em que os números indicam os locais de recolha de amostras, os círculos interiores coloridos indicam a espécie isoladas, os outros círculos coloridos indicam os alelos dos tipos de sequência 16S. O asterisco indica as sequências obtidas do GenBank (figura adaptada de Freel et al., 2012).

### 1.7.2 Metabolitos secundários de *Salinispora* sp.

Desde a divulgação do composto salinosporamida A, em 2003 [17] que o género *Salinispora* tem sido alvo de estudo de novos metabolitos secundários, com potencial biotecnológico.

A salinosporamida A é um  $\beta$ -lactona  $\gamma$ -lactâmico bicíclico isolado de um actinomiceta marinho obrigatório, a *Salinispora tropica*. Este metabolito é um inibidor proteosomático ativo oralmente, que induz apoptose em células múltiplas do mieloma, com um mecanismo distinto do inibidor proteosomático anticancerígeno comercial “*Bortezomib*” [6], [17], [34].

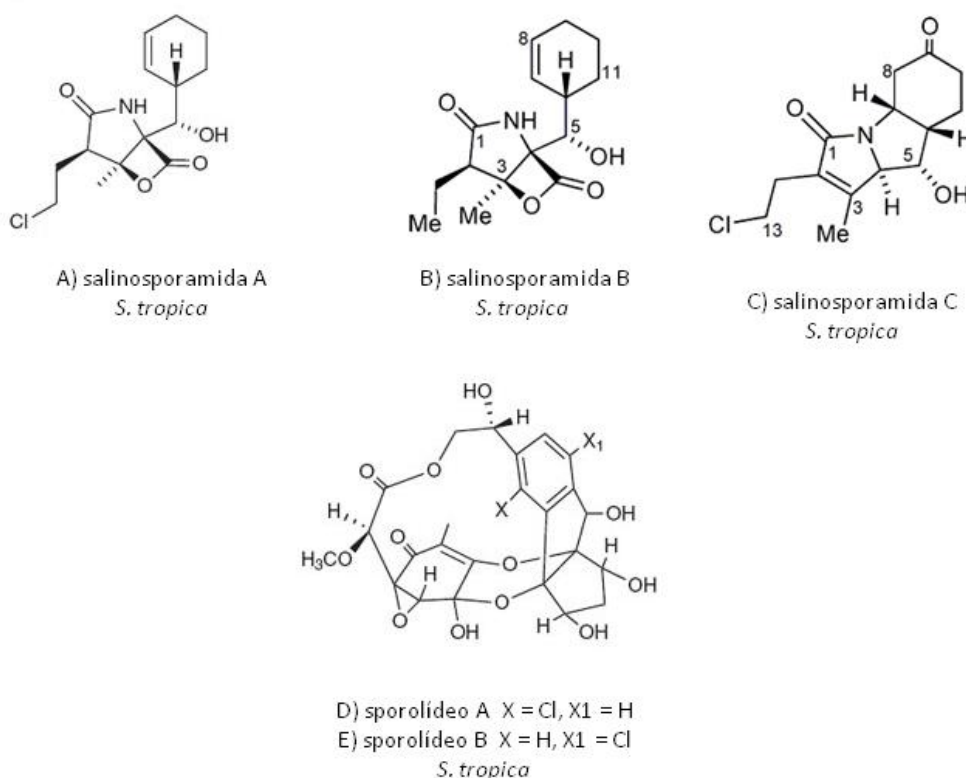
Tem sido desenvolvido pela empresa farmacêutica Nereus Pharmaceuticals, Inc. como NPI-0052, e está a ser avaliado em múltiplas fases, para tumores sólidos, linfoma, múltiplo mieloma. O NPI-0052 representa o primeiro candidato clinico para tratamento de cancro produzido por fermentação salina de um actinomiceta marinho obrigatório [6].

Para além da salinosporamida A (fig. 1.2.A) foram reportados outros metabolitos secundários produzidos por *S. tropica*, entre eles encontram-se salinosporamida B e C (fig. 1.2.B e C) [35] e esporalídeo A e B fig. 1.2.D e E) [34], em que os primeiros possuem atividade citotóxica.

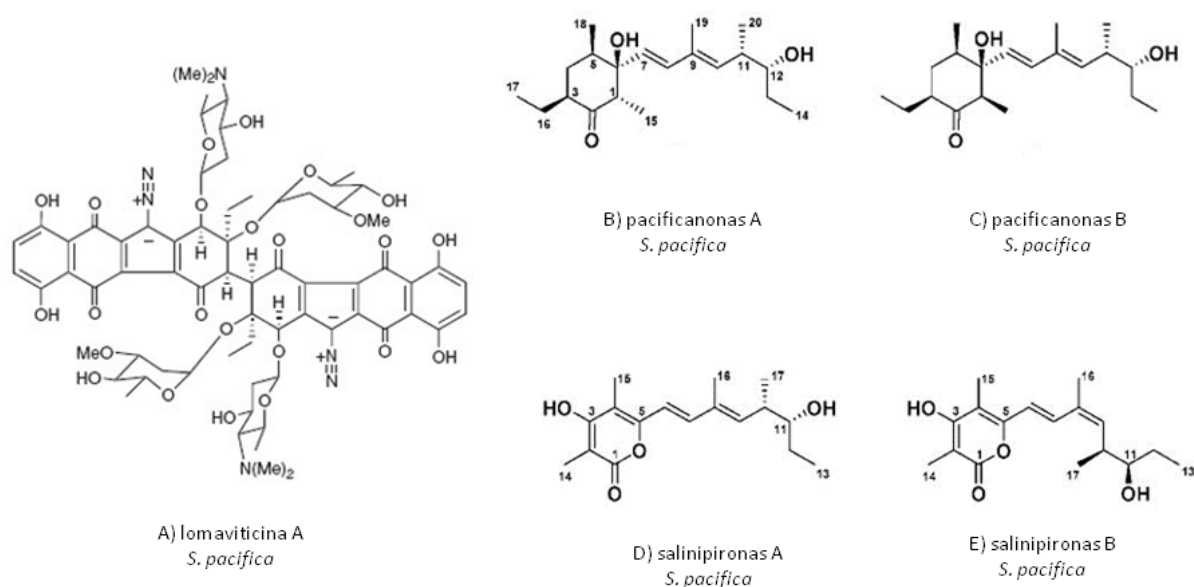
Quanto à espécie *S. pacifica* foram reportados metabolitos secundários como a lomaviticina A (fig. 1.3.A) tendo atividade citotóxica [6], pacificanonas A e B (fig. 1.3.B e C)

que possuem atividade antibacteriana e salinipironas A e B (fig. 1.3.D e E) também com atividade citotóxica [36].

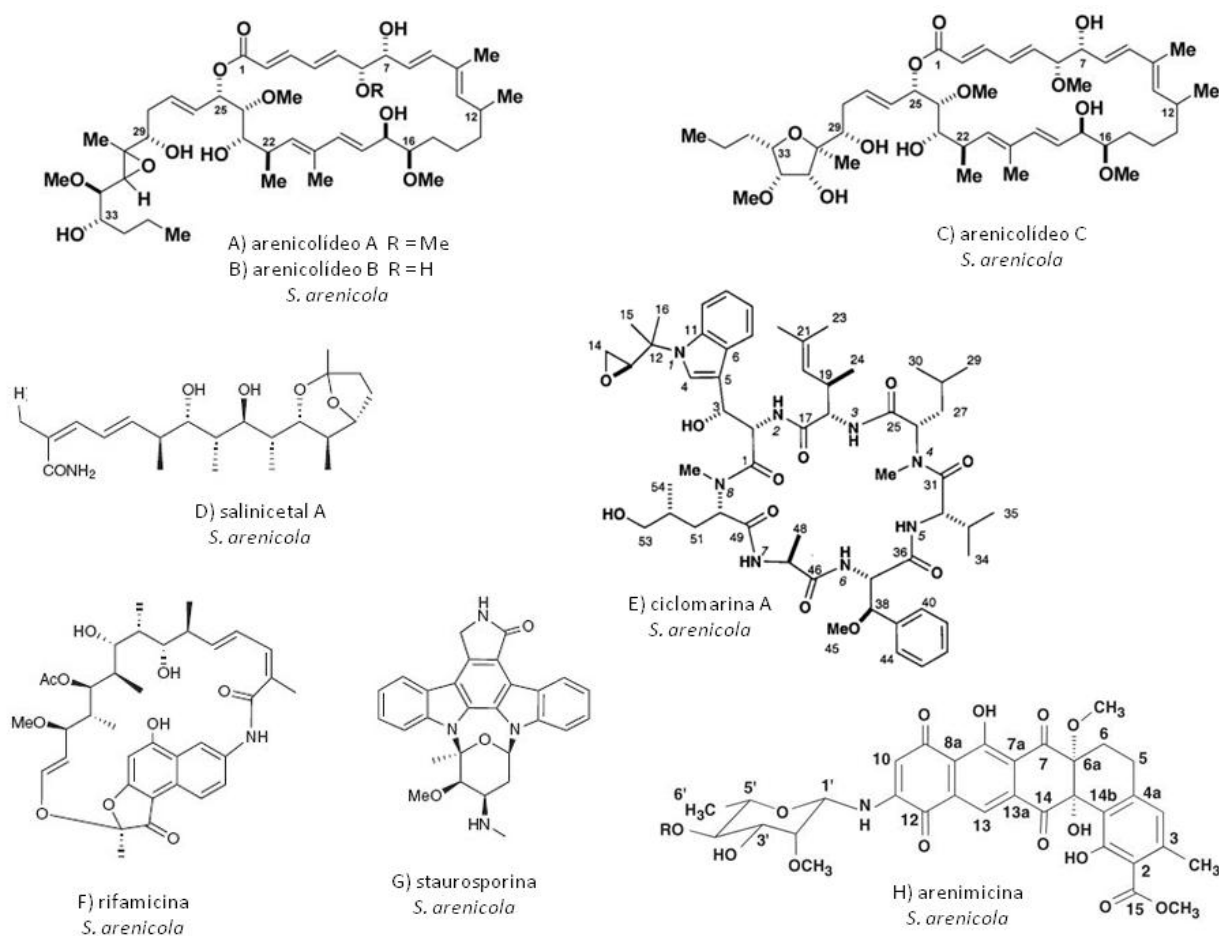
A espécie *S. arenicola* foi documentada por produzir também metabolitos secundários de interesse, como os arenicolídeos A-C (fig. 1.4 A, B e C) com atividade citotóxica, salinicetal A (fig. 1.4 D) com atividade quimo-preventiva contra cancro, ciclomarina A (fig. 1.4 E) com atividades anti-inflamatória e antiviral, rifamicina e staurosporina (fig. 1.4 F e G) com atividades antibiótica e anticancerígena respectivamente [34], [37] e a arenimicina (fig. 1.4 H) com atividade antibacteriana e anticancerígena [38].



**Figura 1. 2**– Estruturas dos compostos bioativos produzidos por *Salinispora tropica*. A) salinosporamida A; B) salinosporamida B; C) salinosporamida C; D) sporolídeo A em que o grupo X é substituído por CL e o X1 por H; E) sporolídeo A em que o grupo X é substituído por H e o X1 por Cl (figuras adaptadas de Jensen et al. 2007; Williams et al. 2005).



**Figura 1. 3**– Estruturas dos compostos bioativos produzidos por *Salinispora pacifica*. A) lomaviticina A; B) pacificanonas A; C) pacificanonas B; D) salinipironas A; E) salinipironas B (figuras adaptadas de Fening e Jensen 2006; Oh et al. 2008).



**Figura 1. 4** – Estruturas dos compostos bioativos produzidos por *Salinispora arenicola*. A) arenicolídeos A em que o grupo R é substituído por Me; B) arenicolídeos B em que o grupo R é substituído por H; C) arenicolídeos C; D) salinictetal A; E) ciclomarina A; F) rifamicina; G) staurosporina; H) arenimicina (figuras adaptadas de Jensen et al. 2007; Williams et al. 2007; Asolkar et al. 2010).

## 1.8 Contextualização do trabalho e objetivos

No contexto atual de Portugal, os assuntos relacionados com o mar são alvo de muitas atenções, como é o exemplo da proposta por parte da EMPC (Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental) [39] de extensão da plataforma continental para além das 200 milhas náuticas. Dentro dos objetivos definidos para este grupo está a coordenação do projeto M@rBis (Marine Biodiversity Information System) [40].

Dentro dos objetivos do projeto M@rBis destacam-se os seguintes:

- Desenvolver um sistema de informação por forma a compilar os dados de biodiversidade marinha dispersa nas diversas entidades, permitindo a sua georreferenciação e proporcionando que sejam acedidos pela comunidade científica, pelas entidades administrativas e pelo público em geral, de acordo com os padrões das bases de dados internacionais;
- Identificar e colmatar as lacunas de informação relativas aos organismos e habitats marinhos das águas sob jurisdição nacional;
- Constituir uma ferramenta de trabalho e de planeamento para a comunidade científica nacional;

Este interesse nos assuntos do mar foi também referenciado por órgãos de soberania, como escreveu Miranda Calha, Deputado da Assembleia da República na revista Cluster do Mar [41], a ENM 2013-2020 (Estratégia Nacional para o Mar) reforça a intenção de proteger o Oceano e de o explorar de forma sustentável, a partir de um modelo de desenvolvimento a longo prazo, assente nos pilares do crescimento inteligente, sustentável e inclusivo, a que se chamou na Europa o “Crescimento Azul”. Este identifica 5 domínios estratégicos de intervenção, entre os quais a biotecnologia azul.

Os actinomicetas de origem marinha, como referido, são considerados de interesse com vista à descoberta de novos metabolitos secundários com atividade biológica.

Deste modo o presente trabalho visa contribuir para uma melhor compreensão da biodiversidade de actinomicetas e as propriedades bioativas dos metabolitos secundários que produzem.

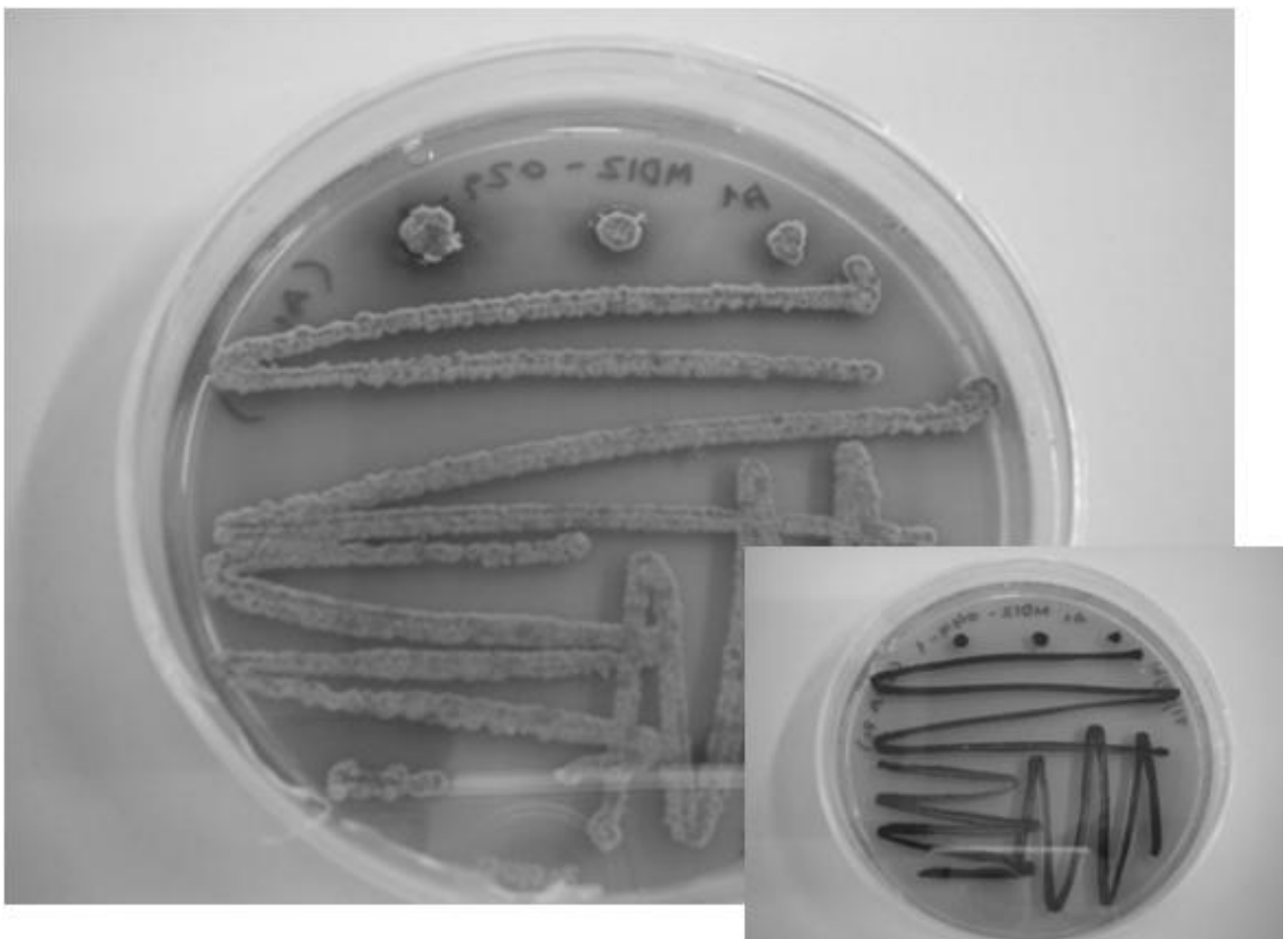
Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Isolar estirpes com características morfológicas semelhantes a actinomicetas, a partir de sedimentos marinhos recolhidos de áreas inexploradas, como é o caso do Arquipélago da Madeira.

- Identificar as estirpes com base na sequenciação do gene 16S rRNA e comparação de sequências existentes em bases de dados públicas.
- Avaliar a ocorrência de espécies raras do género *Salinispora* neste território.
- Obter extratos químicos (crudes) a partir das culturas de actinomicetas.
- Avaliar a atividade inibitória dos crudes em microrganismos multirresistentes (MRSA - Methicillin resistant *S. aureus*; VRE - Vancomycin resistant *Enterococcus*), em fungos (*Candida albicans*) e em células de carcinoma do cólon humano (linhas celulares HCT-116)



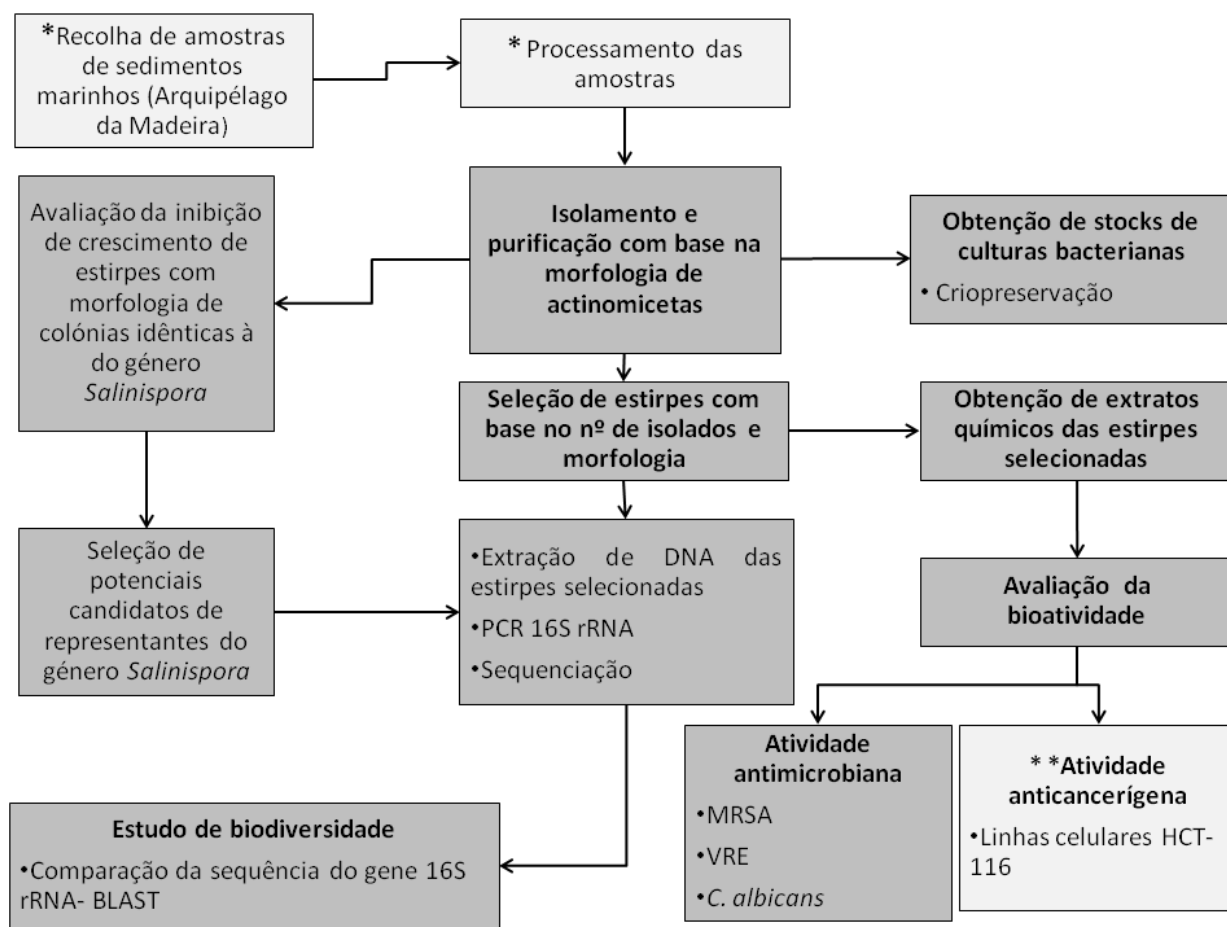
## Capítulo 2. Materiais e Métodos





## 2 Materiais e Métodos

O trabalho experimental, no âmbito desta dissertação, foi iniciado com o isolamento e purificação de bactérias gram-positivas, especificamente, actinobactérias ou actinomicetas, de amostras de sedimentos marinhos, recolhidos no plano do projeto ref.-PTDC/QUI-QUI/119116/2010, A metodologia para a recolha dos sedimentos marinhos está descrita seguidamente com base no relatório da expedição elaborado pelos participantes. A figura 2.1 ilustra as etapas das metodologias deste trabalho.

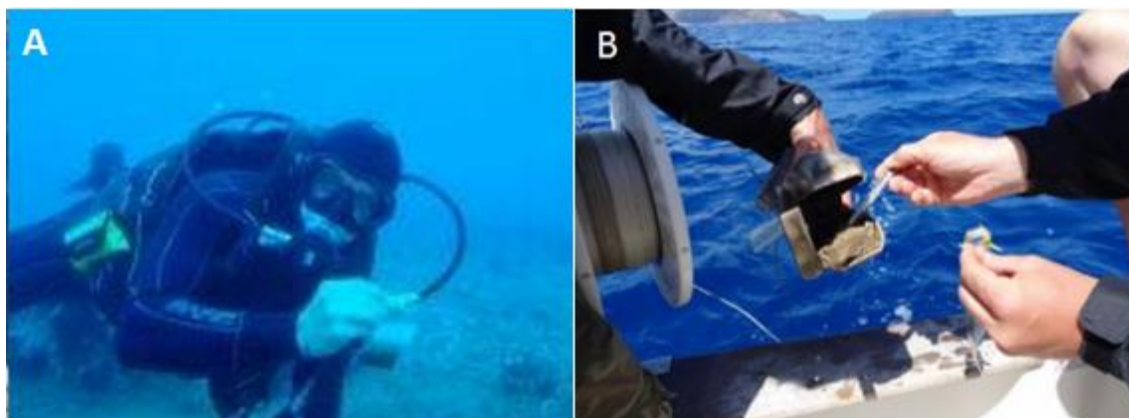


**Figura 2. 1**– Fluxograma do trabalho experimental desenvolvido para esta Dissertação; \*Trabalhos realizados anteriormente ao trabalho experimental desta Dissertação; \*\* Trabalho realizado pelo grupo de investigação de biologia molecular e celular de sistemas eucarióticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, coordenado pela Profª Doutora Cecília Rodrigues.

## Recolha de amostras de sedimentos marinhos

A recolha de amostras de sedimentos marinhos realizou-se de 4 a 17 de Junho de 2012 no arquipélago da Madeira.

As amostras recolhidas nas águas superficiais foram obtidas com recurso de mergulho (Fig.2.2A), as amostras de profundidade obtiveram-se com o uso de um coletor de lamas, recolhido por um carroto elétrico (Fig.2.2B).



**Figura 2. 2-** Técnicas de amostragem à superfície, até aos 30 metros (A) e em profundidade, até aos 1310 metros (B).Imagens gentilmente cedidas por S. Gaudêncio.

Foram obtidas cerca de 662 amostras de sedimento, das quais 42 são de profundidade, variando entre os 129 e os 1310 metros de profundidade.

Das 662 amostras de sedimento oceânico obtidas, 198 foram processadas no local, na Estação Biológica da Marina (MBS), Funchal, usando os métodos S1 e S2 utilizando três meios de cultura: meio A1,  $1/2$ A1 e SWA todos com adição de 50  $\mu\text{g/ml}$  de ciclohexamida, dando um total de 594 placas primárias. Os métodos encontram-se descritos na secção Métodos (pág. 25) e os meios na secção Meios de cultura, Soluções e Tampões (pág. 33).

As amostras de sedimento foram conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , sendo posteriormente descongeladas e analisadas utilizando o método P1 em dois meios de cultura: meio A1 com 100  $\mu\text{g/ml}$  de ciclohexamida e meio SWA com 100  $\mu\text{g/ml}$  de ciclohexamida, tendo-se obtido um total de 1324 placas primárias. O trabalho foi realizado a partir de um total de 1918 placas primárias mantidas à temperatura ambiente durante 6 meses, para a propagação dos microrganismos.

Métodos:

- S1: Adicionou-se 0.5g de sedimento (húmido) em 2 ml de água do mar e agitou-se. Aqueceu-se a 55°C durante 6 minutos, seguidamente espalhou-se 100 µl de sobrenadante nas placas com meio de cultura.
- S2: Idêntico ao método S1 mas espalhou-se 50µl em cada placa.
- P1: Secou-se 0.5g de sedimento em condições de assepsia durante 24 horas. Seguidamente estampou-se o sedimento nas placas com meio de cultura utilizando algodão previamente esterilizado.

## 2.1 Isolamento e purificação de actinomicetas

Após 30 dias e ao longo de 6 meses foram seleccionadas as placas que continham colónias com características de actinomicetas, nomeadamente as colónias com produção de esporos, presença de micélios bem como um aspeto baço na base da colónia [42].

Estas colónias foram isoladas em placas de Petri com meio A1 sólido, com o auxílio de palitos esterilizados, sendo acondicionadas em seguida à temperatura ambiente. Nos casos em que as placas se apresentavam contaminadas, o processo foi repetido até se obter colónias puras.

Todo o processo de isolamento foi feito em bancada, com chama produzida pelo bico de Bunsen, de forma a garantir condições de assepsia necessárias.

## 2.2 Rastreio de colónias semelhantes a *Salinispora* sp.

Durante o processo de isolamento e purificação, as colónias que apresentavam tons de laranja, preto ou ambas (fig. 2.3) foram também inoculadas em placas com 7 ml de meio A1DI (meio de cultura sem água do mar). Este processo teve como objetivo o rastreio de estirpes de actinomicetas marinhos do género *Salinispora*, que é dependente de sal para crescer [5].



**Figura 2. 3-** Da esquerda para a direita: colónias de *actinomicetas* de tons laranja, colónias de tom preto e colónias de cor laranja com esporos pretos, estes são aspetos característicos de estirpes do género *Salinispora*.

### **2.3 Propagação das estirpes em meio A1 líquido**

Após a obtenção de colónias isoladas e purificadas das estirpes, estas foram inoculadas em 10 ml de meio A1 líquido em tubos *falcon* de 50 ml.

As culturas foram incubadas a 25°C com agitação entre três a sete dias, até se observar agregados, por vezes esféricos. Para algumas destas culturas foi necessário prolongar o tempo de propagação.

### **2.4 Criopreservação**

A conservação das culturas na presença de 15% de glicerol foi efetuado misturando em microtubos de 1,5 ml cerca de 700 µl de cultura e 300 µl de glicerol a 50% e foram armazenados a -80 °C.

Este processo foi feito para todas as culturas isoladas e de cada cultura foram congeladas nove alíquotas.

### **2.5 Critério de seleção das estirpes para os estudos de biodiversidade e potencial biotecnológico**

Com o objetivo de estudar a biodiversidade da comunidade de actinomicetas nas águas que circundam o arquipélago da Madeira, bem como o seu potencial biotecnológico, mas limitar o estudo a uma seleção considerada representativa do total de estirpes isoladas, foi aplicado um critério de seleção baseado em diversas variáveis observáveis nas colónias e no meio de cultura: morfologia da colónia nomeadamente a cor da base, a cor dos esporos e a cor do meio de cultura.

Considerando colónias com determinada morfologia, quando o total foi  $\leq 3$  estirpes foram selecionadas para o estudo todas (100%) quando o total foi  $\geq 4$  e  $<25$  foram selecionadas aleatoriamente 50% das estirpes isoladas, quando o total foi  $> 25$  foram selecionadas aleatoriamente 20% das estirpes isoladas. Deste modo, de um total de 333 estirpes isoladas foram selecionadas para os estudos subsequentes 124 estirpes.

### **2.6 Produção de extratos químicos**

Para a produção de extratos químicos (extratos brutos ou crudes), as culturas foram inoculadas em três tubos *falcon*, contendo 30 ml de meio A1 cada um, fazendo um total de 90 ml de cultura.

As culturas foram incubadas a 25°C com agitação durante sete dias, após este período foi trocado o meio de cultura, cerca de 20 ml e incubado de novo durante sete dias.

No fim deste processo esperou-se uma lise celular, em que os compostos produzidos pelas culturas se encontrassem no meio de cultura, dando um aspeto turvo ao meio.

Os 90 ml de cultura foram colocados numa ampola de decantação onde se adicionou 200 ml de acetato de etilo, agitando-se a ampola até a mistura estar homogeneizada. Deixou-se repousar até serem visíveis duas fases distintas, descartando a fase aquosa e ficando apenas com o solvente orgânico e os compostos expelidos pelas células.

Esta fase orgânica foi levada para um evaporador rotativo, onde o solvente foi evaporado, ficando um concentrado com os compostos produzidos pelas culturas. Neste processo não se evaporou o solvente à secura, o concentrado foi transferido para frascos e submetido a uma secagem sob azoto.

Após este processo, os extratos brutos assim obtidos foram colocados numa linha de vácuo durante 24 horas, para eliminar qualquer vestígio de solvente.

## **2.7 Determinação da Concentração Inibitória Mínima dos extratos químicos (crudes)**

Para determinar o valor da concentração inibitória mínima ou MIC dos extratos, foram utilizadas duas estirpes bacterianas multirresistentes. *Staphylococcus aureus* COL, resistente à meticilina (MRSA, “Methicillin resistant” *S. aureus*) e *Enterococcus faecium* EF82 (VRE, “Vancomycin resistant” *E. faecium*) e uma estirpe de referência *Candida albicans* 3436 da coleção PYCC (Portuguese Yeast Culture Collection.). Utilizou-se os extratos brutos com uma concentração de 10mg/ml, em DMSO.

Para este procedimento foi utilizado o método padronizado internacional com algumas alterações a seguir descritas [43].

Num tubo *falcon* adicionou-se 10 ml de meio BHI, onde se inoculou a estirpe MRSA, incubando a 37°C, com agitação durante a noite. Após a incubação foi quantificada a DO<sub>600</sub> através de espectrofotometria (Ultrospec™ 3100 pro UV/Visible). O valor adequado de DO<sub>600</sub> foi entre 0.04 a 0.06, nos casos em que este valor não se observou procedeu-se a uma diluição.

Alíquotas da cultura já diluída com a DO<sub>600</sub> acima referida, foram distribuídas em poços de uma placa de 96 poços, bem como os extratos químicos, o DMSO e a solução de vancomicina (1 mg/ml) como se observa na figura 2.4. O DMSO foi utilizado para controlar a viabilidade da cultura sem o extrato bruto, a solução de vancomicina foi usada para controlar a inibição do crescimento celular da estirpe MRSA e a não inibição da cultura da estirpe VRE. O meio BHI foi utilizado como controlo de esterilidade, a cultura adicionada ao poço 11G foi utilizada para controlar a propagação da cultura (sem qualquer suplemento – extrato bruto, solução de DMSO ou de vancomicina).

Após preencher os poços como mostra a figura a baixo, com uma micropipeta multicanal foram retirados 100 µl da fila A até à posição 10 e diluiu-se na fila B, e assim consecutivamente até à fila F, resuspendidos entre diluições. Deste modo foi criado um fator de diluição do extrato, que vai inicialmente de  $2.5 \times 10^{-1}$  e seguidamente  $1.3 \times 10^{-1}$ ,  $6.3 \times 10^{-2}$ ,  $3.1 \times 10^{-2}$ ,  $1.6 \times 10^{-2}$  até  $7.8 \times 10^{-3}$  µg/µl., da fila A à fila F respetivamente.

A placa foi incubada a 37°C durante a noite, e os resultados registados após 18 a 24 horas.

Nesta avaliação foi observada a diferença de turbidez da cultura em cada poço, por comparação com a cultura no poço G11 e o poço G12 com meio BHI.

Foi considerado como valor de MIC de cada extrato bruto testado a concentração mínima do extrato bruto para a qual já não se observou crescimento da cultura bacteriana.

Este procedimento foi idêntico para as estirpes VRE e para *C. albicans*, neste ultimo caso com a alteração do meio de cultura, o qual foi utilizado o meio YM.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (extrato)	195 µl (cultura ) 5 µl (DMSO)	195 µl (cultura ) 5 µl (Vancom)
B	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )		
C	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )		
D	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )		
E	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )		
F	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )	100 µl (cultura )		
G											100 µl (cultura )	100 µl (BHI)
H												

**Figura 2. 4-** Volumes das culturas bacterianas, extratos brutos, solução de DMSO e solução de vancomicina colocados nas placas de 96 poços.



## 2.8 Determinação da atividade citotóxica dos extratos químicos (crudes)

Os ensaios que permitiram determinar a atividade citotóxica dos crudes, foram realizados pelo grupo de investigação de biologia molecular e celular de sistemas eucarióticos da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, ao cuidado da Prof<sup>a</sup> Doutora Cecília Rodrigues. Os crudes microbianos foram testados em linhas celulares HTC-116 (carcinoma do cólon humano) com uma concentração inicial de 10mg/ml, em DMSO .

Para estes ensaios foi utilizado o método colorimétrico MTS, testando os crudes a várias concentrações:  $8.0 \times 10^{-5}$  mg/ml,  $3.05 \times 10^{-4}$  mg/ml,  $1.22 \times 10^{-3}$  mg/ml,  $4.88 \times 10^{-3}$  mg/ml,  $1.95 \times 10^{-2}$  mg/ml e  $7.81 \times 10^{-2}$  mg/ml.

## 2.9 Extração de DNA para amplificação do gene 16S rRNA

Para o processo de extração de DNA foi utilizado, inicialmente, um *kit* comercial para o isolamento e purificação de DNA (Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit, Promega Madison, WI, USA). Foi utilizado o protocolo fornecido pelo fabricante, com algumas alterações descritas seguidamente.

Adicionou-se 1ml de cultura num microtubo de 1.5 ml, centrifugando a 13000 rpm durante quatro minutos, desprezando o sobrenadante.

Ao *pellet* foi adicionado 480 µl de EDTA (50mM) e 120 µl de lisozima (10mg/ml) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) ressuspensando gentilmente com a micropipeta para misturar. Seguidamente a suspensão foi incubada a 37°C com agitação durante um período de uma a três horas.

Após a incubação, a suspensão foi centrifugada a 13000 rpm desprezando o sobrenadante, foi adicionado então 600µl de solução de lise, ressuspensando gentilmente para misturar, a suspensão foi incubada a 80°C durante cinco minutos, arrefecendo depois à temperatura ambiente. Adicionou-se 3 µl de solução de RNase (4 mg/ml), misturando apenas por inversão do microtubo sendo novamente incubada nas mesmas condições referidas anteriormente.

Seguidamente, foram adicionados 200µl de solução de precipitação proteica à mistura, misturando no *vortex*, durante 20 segundos, incubando em gelo a seguir, durante dez minutos.

A suspensão foi centrifugada a 13000 rpm a 4°C durante 30 minutos. Transferiu-se o sobrenadante para um novo microtubo com 600µl de isopropanol à temperatura ambiente, invertendo o tubo gentilmente até ser visível uma “massa” de DNA.

Em seguida, a mistura foi centrifugada novamente a 13000 rpm a 4°C, durante 30 minutos, desprezando o sobrenadante. Ao *pellet* foi adicionado 600 µl de etanol a 70%, invertendo várias vezes gentilmente até o *pellet* se soltar, lavando assim o DNA. Centrifugou-

se, novamente, a 13000 rpm a 4°C durante 15 minutos, desprezando o sobrenadante. Após a remoção do etanol, os microtubos foram deixados a secar ao ar, até o etanol evaporar.

No final o DNA foi suspenso em 100µl de solução de reidratação e incubado durante a noite a 4°C.

Após a hidratação do DNA, foi quantificada a sua concentração através do espectrofotômetro UV/VIS (NanoDrop 2000, Thermo Scientific®, Wilmington).

Para além da quantificação do DNA, foi também monitorizada a sua qualidade através de eletroforese, com gel de agarose 1%, com gel Red<sup>TM</sup> Biotium incorporado através de uma voltagem de 120 volts. Foi utilizado azul bromofenol (Merck®, Darmstadt) como tampão de arrastamento, cerca de 3µl por amostra, o marcador utilizado foi o 1 kb DNA Ladder NEB (New England BioLabs® inc.). Tanto para o marcador como em cada amostra foi utilizado um volume de 4 µl.

## 2.10 Amplificação do gene 16S rRNA por PCR

Através da técnica de PCR amplificou-se o gene 16S rRNA do DNA extraído de cada estirpe, com os *primers* 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3') [45].

Em paralelo com as amostras foi realizado também a amplificação do gene 16S rRNA com DNA da estirpe *Staphylococcus aureus* COL como controlo do método.

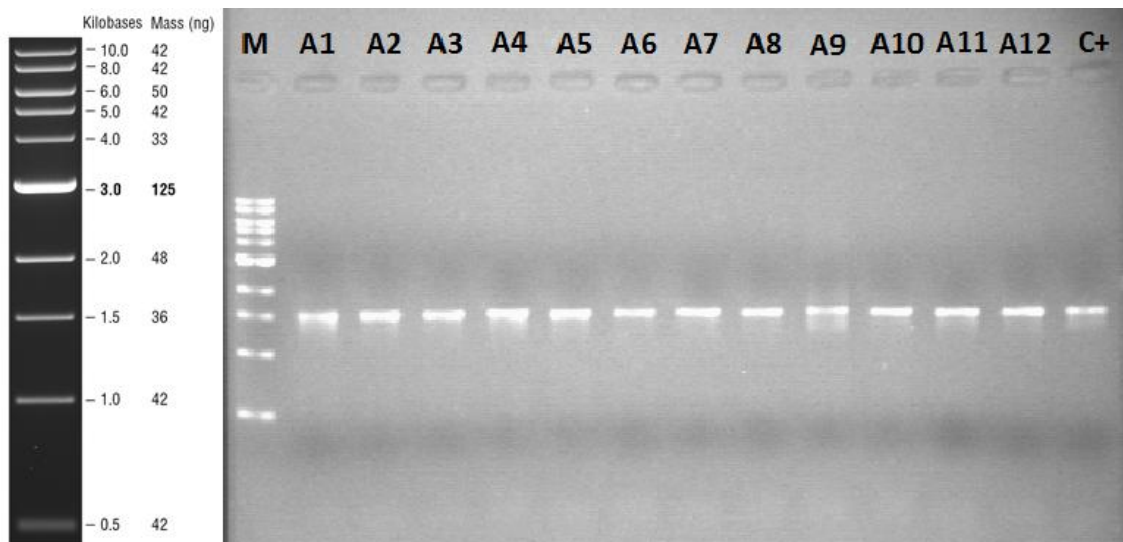
Para o processo de amplificação do gene 16S rRNA utilizou-se os seguintes reagentes por reação:

- 5 µl de *Buffer* 10x
- 2 µl de dNTPs (2 mM)
- 2 µl de *primer forward* 27F (20pmol)
- 2 µl de *primer reverse* 1492R (20pmol)
- 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM)
- 0.5 µl de Taq DNA Polimerase
- 35 µl de água Milli Q
- 1 µl de DNA (± 50 ng)

No total esta mistura perfaz 50 µl por cada amostra de DNA. Os reagentes a cima referidos foram adquiridos através da Invitrogen® Life Technologies S.A., Madrid.

No procedimento da técnica de PCR foi utilizado um termociclador (marca Biometra® T1 Thermocycler, Goettingen), com o seguinte programa: 2 min. a 95°C, 30 ciclos de 30 seg. a 95°C, 30seg. a 50°C e 100 seg. a 72°C seguido de 10 seg. a 72°C para o passo de extensão final.

O produto de PCR foi mantido a 4°C até à sua utilização [45]. Para monitorizar a qualidade dos produtos de PCR, bem como a sua dimensão (em pb), foi realizado uma eletroforese, nas mesmas condições do procedimento anterior, como é exemplificado na figura 2.5.



**Figura 2. 5-** Representação do marcador utilizado 1 kb DNA *Ladder* NEB (New England BioLabs® inc.) à esquerda; exemplo de um gel de agarose 1% com produtos de PCR do gene 16S rRNA com 1,5 kb, M-marcação, A# nº da amostra, C+ controlo positivo (utilizou-se DNA da estirpe *S. aureus* COL como controlo do método).

## 2.11 Purificação do produto de PCR

Os produtos de PCR foram purificados através do *kit* SureClean (Bioline A Meridian Life Science® Company) de acordo com o protocolo do fabricante.

Adicionou-se um volume de SureClean igual ao do produto de PCR 50 µl, misturando-se através de inversão do microtubo, em seguida deixou-se a solução a incubar à temperatura ambiente durante dez minutos. Centrifugou-se a 13000 rpm durante dez minutos, desprezando o sobrenadante.

Adicionou-se etanol a 70%, num volume duas vezes o volume inicial da amostra 100 µl, misturou-se no *vortex*, cerca de dez segundos, em seguida centrifugou-se a 13000rpm durante dez minutos, desprezando o sobrenadante. No final ressuspendeu-se o produto em água Milli Q (Milipore) para uma concentração final de 20 ng/µl.

## 2.12 Sequenciação do gene 16S rRNA

Para a sequenciação dos produtos de PCR, recorreu-se aos serviços da empresa STABVida, Setúbal, Portugal. Para esta finalidade, foi utilizado o método de sequenciação Sanger [46], com um sequenciador 3730xl da Applied Biosystems.

Foram utilizados os mesmos *primers* que se usaram no processo de amplificação do gene 16S rRNA.

### 2.13 Identificação taxonômica e análise filogenética

Os resultados da sequenciação do gene 16S rRNA foram comparados com sequências da base de dados de 16S RNA ribossomal de Bactérias e *Archaea* do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), depositadas no *GenBank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Na produção das sequências consenso foi utilizado o *software BioEdit biological sequence alignment editor* versão 7.2.0. (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) da seguinte forma:

- Usaram-se os ficheiros com os resultados da sequenciação *forward* e *reverse* no formato AB1.
- Selecionou-se a sequência *reverse* e aplicou-se a ferramenta para inverter a sequência no complementar.
- Alinhou-se as sequências através da ferramenta *ClustalW Multiple alignment* e criou-se a sequência consenso.
- Com a sequência consenso em formato *fasta* utilizou-se a ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) para comparar com a base de dados do NCBI.

Para a identificação das relações filogenéticas utilizou-se o valor percentual de identidade máxima de cada espécie usando o seguinte critério: valores de identidade máxima > 98% foram considerados da mesma espécie, sendo valores inferiores considerados apenas ao nível do género [28].

Na construção das árvores filogenéticas foi utilizado a ferramenta *online ClustalW2-Phylogeny* ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2\\_phylogeny/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/phylogeny/clustalw2_phylogeny/)) utilizando o método de *Neighbour-joining* com correção de distâncias, exclusão de “falhas” (Gaps) e com percentagem de matriz de identidade (P.I.M.). Os alinhamentos para a árvore filogenética foram feitos com a ferramenta *ClustalW Multiple alignment* disponível no *software BioEdit*, com valores de “*Bootstrap*” igual a 1000 replicações. As sequências foram obtidas com a ferramenta BLAST com a base de dados da NCBI comparando com todas as sequências do gene 16S rRNA das estirpes PTM#, os melhores resultados foram utilizados para construir as árvores filogenéticas.

## **Meios de cultura, Soluções e Tampões**

Todos os meios de cultura aqui referidos foram autoclavados a 121°C durante 20 minutos, com a exceção da solução de glicerol a 50% que foi autoclavada a 110°C durante 20 minutos.

### **1. A1 (1 litro)**

- Água bidestilada – 250 ml
- Água do mar – 750 ml
- Amido – 10 g
- Extrato de levedura – 4 g
- Peptona – 2 g
- Agar – 18 g (meio sólido)

### **2. ½ A1 (1 litro)**

- Água bidestilada – 250 ml
- Água do mar – 750 ml
- Amido – 5 g
- Extrato de levedura – 2 g
- Peptona – 1 g
- Agar – 18 g (meio sólido)

### **3. SWA (1 litro)**

- Água bidestilada – 250 ml
- Água do mar – 750 ml
- Agar – 18 g (meio sólido)

### **4. A1DI (1 litro)**

- Água bidestilada – 1000 ml
- Amido – 10 g
- Extrato de levedura – 4 g
- Peptona – 2 g
- Agar – 18 g (meio sólido)

### **5. BHI (1 litro)**

Brain Heart Infusion, (DIFCO Laboratories, Detroit, USA)

- BHI – 37 g
- Água bidestilada – 1000 ml

### **6. TSB (1 litro)**

Tryptic Soy Broth, (DIFCO Laboratories, Detroit, USA)

- TSB – 30 g
- Água bidestilada – 1000 ml

### **7. YM (1 litro)**

- Água bidestilada – 1000 ml
- Extrato de levedura – 3 g
- Peptona – 5 g
- Extrato de malte – 3 g
- Glucose – 10 g
- Agar – 20g (meio sólido)

### **8. Solução de Glicerol a 50% (200 ml)**

- Glicerol 100% - 100 ml
- Água bidestilada – 100 ml

### **9. EDTA 50 mM (100 ml)**

- EDTA – 1.86 g
- Água bidestilada – 100 ml

### **10. Solução de lise nucleica**

- Composição não discriminada pelo distribuidor (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Madison, WI, USA)

### **11. Solução de precipitação proteica**

- Composição não discriminada pelo distribuidor (Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Promega Madison, WI, USA)

## **12. Solução de rehidratação**

- Tris-HCL (pH 7.4) 10mM
- EDTA (pH 8.0) 1mM





## Capítulo 3. Resultados





### 3 Resultados

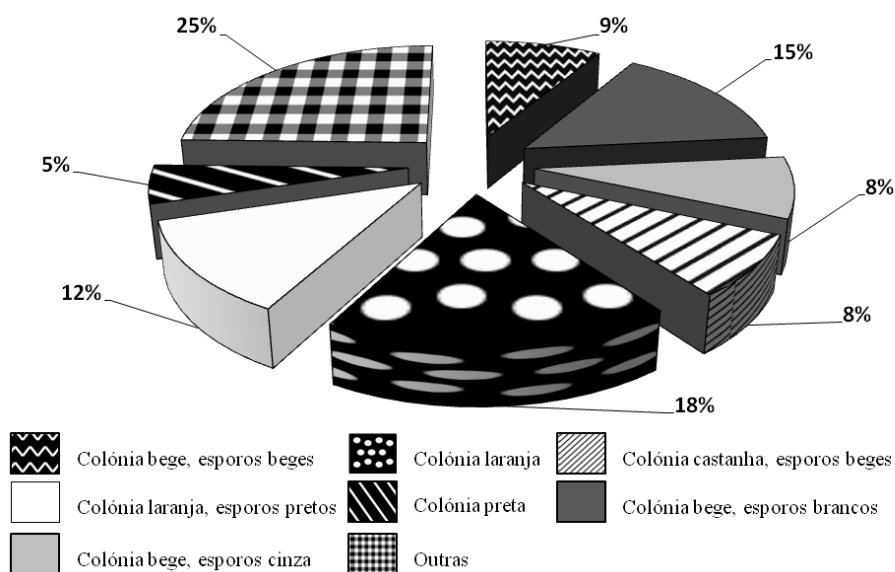
A partir de 662 amostras de sedimento marinho obteve-se um total de 1918 placas primárias, como foi referido anteriormente. Das 1918 placas primárias foi possível isolar, no âmbito desta dissertação, 333 estirpes morfológicamente semelhantes a actinomicetas. Aplicou-se os critérios de seleção de estirpes referidos na secção de Materiais e Métodos, sendo então seleccionadas 124 estirpes e adicionalmente 20 estirpes, como pertencendo possivelmente ao género *Salinispora*, seleccionadas através do método de rastreio descrito na secção de Materiais e Métodos. Os resultados apresentados nesta dissertação foram obtidos com 131 estirpes não sendo as restantes 13 consideradas, por se encontrarem em fase de purificação (dados em anexo).

#### 3.1 Isolamento de colónias morfológicamente semelhantes a actinomicetas

As colónias isoladas apresentaram características morfológicas distintas. Em relação à cor da base das colónias observou-se tons de amarelo, bege, castanho, laranja, preto, roxo, rosa e vermelho. A cor dos esporos foi outra característica avaliada neste trabalho, observou-se padrões de esporos com tons de branco, bege, castanho, cinza, preto e rosa.

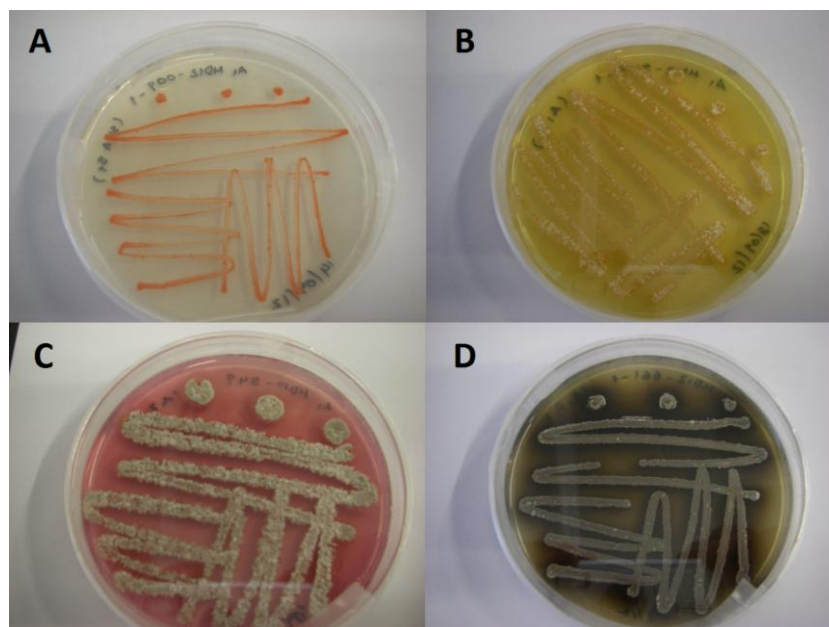
Quanto à produção de esporos observou-se ainda que muitas das estirpes ao longo do tempo apresentavam uma evolução na cor dos esporos, esporos brancos evoluíam para bege, cinza ou rosa, esporos beges evoluíam para castanho.

Os tipos de colónias dominantes neste universo são de estirpes com colónias laranja (12 estirpes:18%), seguido das estirpes com colónias bege com esporos brancos (10 elementos:15%) e as estirpes com base laranja com esporos pretos (8 estirpes:12%) como se pode observar na figura 3.1.



**Figura 3. 1-** Gráfico circular representativo das morfologias das colônias das estirpes em estudo, tendo como características a cor da colônia e a cor dos esporos, a soma do número de colônias com diversas morfologias e percentagens inferiores a 8% estão contabilizadas na fração nomeada de Outras.

Observaram-se algumas estirpes que possivelmente excretavam compostos químicos, alterando a cor do meio de cultura circundante. Estas colorações apresentavam diferentes tons como amarelo, rosa ou mesmo castanho, todos eles translúcidos, como se pode ver na figura 3.2. Este fator também foi tido em conta nos critérios de seleção de estirpes para este projeto.



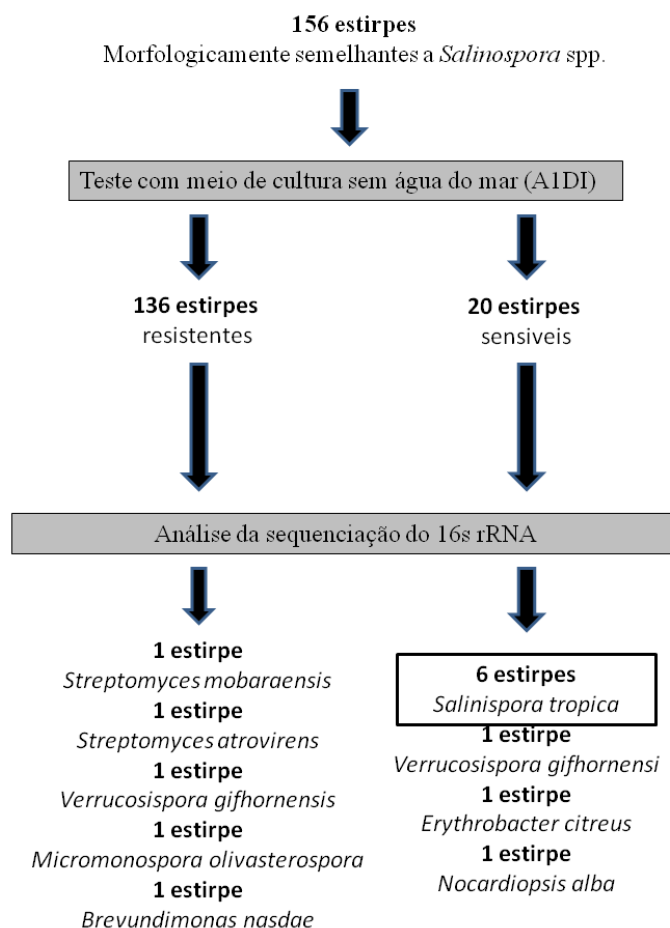
**Figura 3. 2 -** Exemplos de coloração do meio de cultura, possivelmente por excreção de compostos pelas estirpes; A - meio de cultura com cor original, B – meio de cor alterada para amarelo, C – meio de cor alterada para rosa e D – meio de cor alterada para castanho.

### 3.2 Rastreio de colónias morfologicamente semelhantes ao género *Salinispora*

Para o rastreio de colónias com semelhanças morfológicas a *Salinispora* sp. foram avaliadas 156 estirpes com as características referidas nos Materiais e Métodos. Observou-se ao fim de seis meses que, 20 estirpes não se propagaram no meio de cultura A1DI, mostrando serem sensíveis à ausência de sal (figura 3.3).

Através da sequenciação do gene 16S rRNA com os *primers* 27F e 1492R de nove estirpes, foi possível identificar que seis estirpes apresentaram identidade máxima com *Salinispora tropica*: PTM# 44, 60, 78, 93, 114 e 115.

As outras 11 estirpes que não se propagaram no meio de cultura A1DI, não foram sequenciadas, por se encontrarem em fase de purificação, como foi referido anteriormente.



**Figura 3. 3 - Fluxograma.** Estirpes com morfologia semelhante ao género *Salinispora* foram testadas quanto à sensibilidade ao meio de cultura sem água do mar para distinguir estirpes dependentes de sal para se propagarem, sendo este caso uma característica do género *Salinispora*. A análise da sequenciação do gene 16S rRNA foi feita para confirmar a identificação das estirpes.

Foram considerados os valores de identidade máxima > 98% como sendo da mesma espécie.

Os valores de identidade máxima estão representados na tabela 3.1, onde se encontram sumarizadas especificamente as estirpes do género *Salinispora* sequenciadas neste trabalho.

Através deste método foi também possível observar que duas estirpes, PTM-195 e 321 mostraram sensibilidade à ausência de sal do meio de cultura. Estas estirpes apresentaram identidade máxima com as espécies *Verrucosipora giffhornensis* e *Nocardiopsis alba* respetivamente.

### **3.3 Identificação taxonómica das estirpes com base na sequenciação do gene 16S rRNA.**

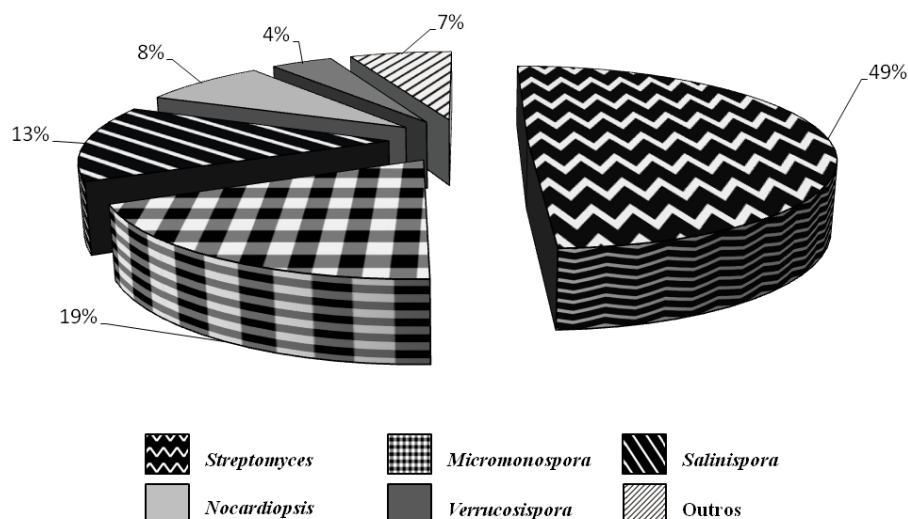
Das 131 estirpes consideradas, nesta parte do trabalho, 82 foram sequenciadas seguindo o critério: valores de identidade máxima > 98% são considerados da mesma espécie, sendo valores inferiores considerado apenas ao nível do género.

Através de uma análise geral ao nível da ordem foi possível observar que a mais representada é *Actinomycetales*, com 75 estirpes (91%), sendo os restantes sete (9%) representados pelas ordens: *Bacillales*, *Pseudomonadales*, *Rhodobacterales*, *Sphingomonadales* e *Caulobacterales*.

Os resultados das sequenciações do gene 16S rRNA podem ser observados na tabela 3.3.

Dentro da ordem *Actinomycetales* foi possível observar uma representação de diferentes géneros tais como: *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Nocardiopsis*, *Verrucosipora*, *Kocuria*, *Nonomuraea*, *Brevibacterium*, *Actinomadura* e *Micrococcus*.

O género *Streptomyces* é o mais representado deste grupo com 37 estirpes (49%) das estirpes consideradas (figura 3.4), seguido por *Micromonospora* com 14 estirpes (19%) e *Salinispora* com 10 estirpes (13%).



**Figura 3. 4** - Gráfico circular representativo em % dos gêneros que pertencem ao universo da ordem *Actinomycetales* neste trabalho, *Streptomyces* 49%, *Micromonospora* 19%, *Salinispora* 13%, *Nocardioopsis* 8% e *Verrucosispota* 4%. A parcela denominada de Outros representa os gêneros *Kocuria*, *Nonomuraea*, *Brevibacterium*, *Actinomadura* e *Micrococcus* com 7% no total.

### 3.3.1 Gênero *Streptomyces*

Em relação às estirpes pertencentes ao gênero *Streptomyces* observou-se uma dominância da morfologia de colônia bege com produção de esporos beges, bem como de colônia bege com esporos cinza, ambas com 14% de representatividade, fazendo um total de 28%.

Quanto aos habitats explorados na recolha dos sedimentos, as estirpes do gênero *Streptomyces* estão representados na maioria dos habitats, havendo uma dominância nas amostras na costa rochosa, cerca de 35% das estirpes foram isoladas neste tipo de habitat. Em relação à profundidade não foi visível uma associação, sendo as estirpes isoladas entre os 10 e os 18 metros, bem como em diferentes profundidades variáveis entre os 576 e os 728 metros.

Das estirpes em que foi sequenciado o gene 16S rRNA, a espécie com maior representatividade do gênero *Streptomyces* é a *S. diastaticus* com 11%, seguida pela *S. aculeolatus* e *S. albus* ambas com 8% do total.

### 3.3.2 Gênero *Micromonospora*

Quanto ao segundo gênero mais representado, o Gênero *Micromonospora*, observou-se uma morfologia dominante de colônia laranja, com esporos pretos, com 29% de representatividade neste gênero, seguido de colônia preta, com 21%.

Cerca de 57% das estirpes, em que foi sequenciado o gene 16S rRNA deste gênero, foram isoladas de sedimentos de areia superficial em profundidade da costa rochosa, a

profundidades entre os 10 e os 20 metros, foram isoladas também estirpes a profundidades de 924 metros.

Foi sequenciado o gene 16S rRNA de quatro estirpes de espécies distintas, *Micromonospora* sp., *M. chaiyaphumensis*, *M. chalcea* e *M. cítrea*, sendo a primeira a mais representada com 36%. Observaram-se também duas estirpes onde se obtiveram valores de identidade de 96 e 94% com *M. coxensis* e *M. olivasterospora* respetivamente.

### **3.3.3 Género *Salinispora***

Nas estirpes que apresentaram uma identidade máxima com o género *Salinispora* observou-se uma preferência pelo habitat da costa rochosa, manchas de areia e costa rochosa, tendo sido isoladas 50% destas estirpes no primeiro habitat e 40% no segundo. Todas as estirpes foram isoladas de sedimentos recolhidos a baixas profundidades entre os 10 e os 16 metros. Não foi isolada nenhuma estirpe em grandes profundidades, como nos casos anteriores, nomeadamente, dos géneros *Streptomyces* e *Micromonospora*.

Morfológicamente estas estirpes apresentam uma dominância pela cor laranja da base da colónia e uma produção de esporos pretos, representando 40% das estirpes identificadas neste género, seguido pelas estirpes com base da colónia preta com 20%.

Na identificação taxonómica destas estirpes foi sequenciado o gene 16S rRNA com os primers 27F e 1492R devido ao interesse específico deste género neste trabalho, foi criada uma sequência consenso e comparada com uma base de dados online como é descrito da secção de Materiais e Métodos.

Foram identificadas 10 estirpes pertencendo a este género, entre as quais nove apresentam uma identidade máxima com a espécie *S. tropica* (NR\_074502.1) e uma com *S. arenicola* (NR\_074612.1) todas com 99% de identidade (tabela 3.1).



**Tabela 3. 1**– Lista de estirpes identificadas usando a sequência consenso do gene 16S rRNA, representantes do género *Salinispora*, com valores de identidade > 98%

Grupo filogenético (género)	Estirpes isoladas	Descrição do habitat e profundidade (m)	Morfologia (colónia, esporos, meio)	Sequência consenso (pb)	Tipo de estirpe mais próxima (nº de acesso)	Identi. da sequência (%)
<i>Salinispora</i>	PTM-44	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Preto	1424	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-60	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Laranja, esporos pretos	1427	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-78	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Laranja	1428	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-89	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Laranja/salmão	1426	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-93	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Laranja, esporos pretos	1423	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-96	Costa rochosa, 15 m	Preto	1426	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-99	Costa rochosa, 15 m	Laranja, meio de cultura escurecido	1427	<i>Salinispora arenicola</i> (NR_074612.1)	99%
	PTM-114	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 16 m	Laranja, esporos pretos	1422	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-115	Costa rochosa, 12 m	Laranja, esporos pretos	1428	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%
	PTM-325	Costa rochosa, 10 m	Bege	1425	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	99%

### 3.3.4 Outros géneros

Na lista de estirpes identificadas pela sequenciação do gene 16S rRNA (tabela 3.3) é possível observar outros géneros pertencentes à ordem *Actinomycetales*, destacando os géneros *Nocardiopsis* e *Verrucosipora* como sendo os mais representativos a seguir aos géneros referidos nos pontos anteriores (figura 3.4). No caso do género *Nocardiopsis* foi possível observar uma dominância pela espécie *Nocardiopsis alba*, enquanto, que no género *Verrucosipora* a única espécie representada foi a *Verrucosipora gifhornensis*.

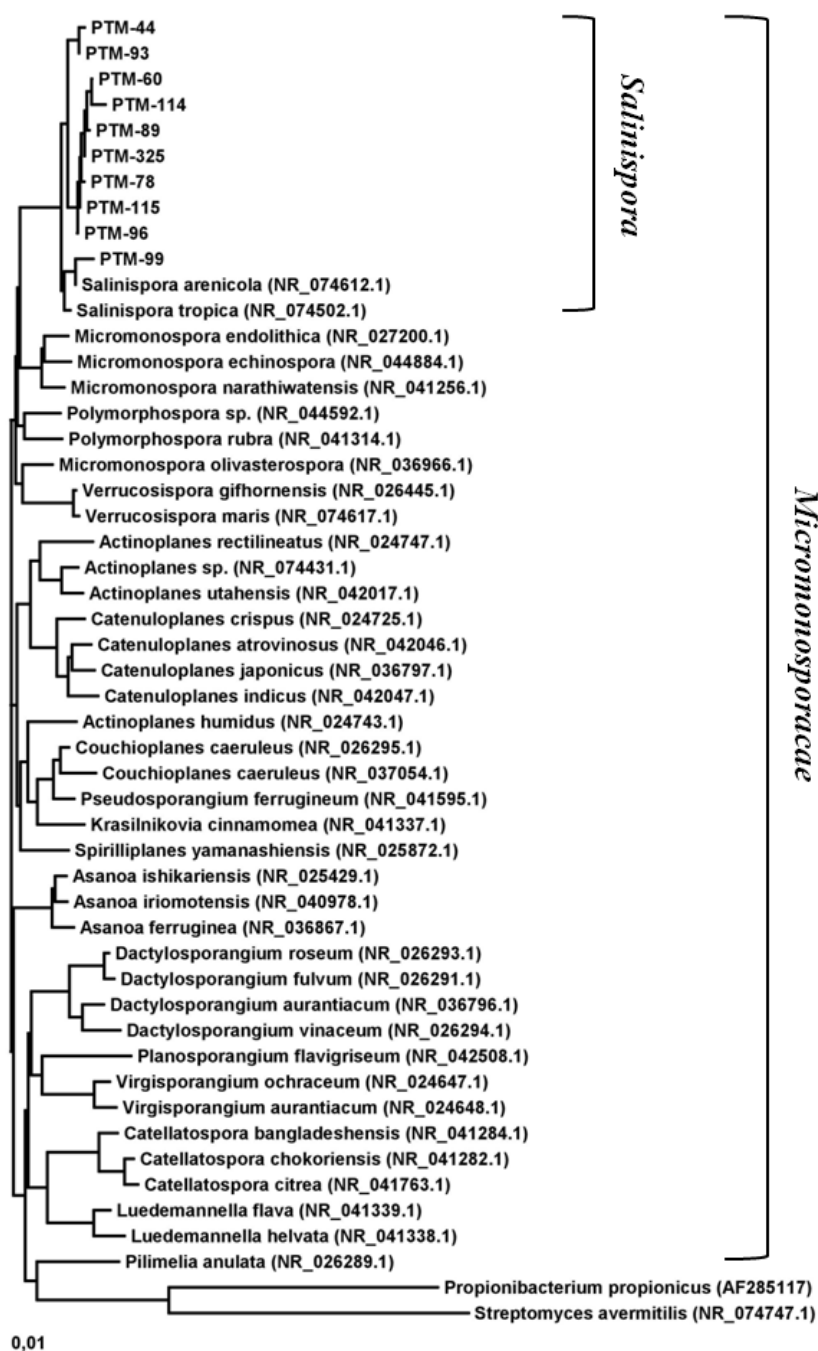
## 3.4 Análise filogenética de estirpes com identidade máxima com o género *Salinispora*

A análise filogenética foi feita através de uma comparação das sequências consenso de todas as estirpes, com identidade com o género *Salinispora* em conjunto (tabela 3.1), com a base de dados da NCBI, como é descrito na secção de Materiais e Métodos.

A partir destes resultados, todas as sequências do gene 16S rRNA destas estirpes foram alinhadas em conjunto com as sequências das estirpes representadas na tabela 3.1, sendo assim construída uma árvore filogenética (figura 3.5).

A árvore filogenética, com base na sequência do gene 16S rRNA, reafirma os resultados observados na tabela 3.1. É possível observar a relação das sequências do gene 16S rRNA das estirpes PTM# com o género *Salinispora*, que formam um grupo distinto dos restantes membros da família *Micromonosporaceae*. É possível observar também a relação de proximidade filogenética entre a estirpe PTM-99 com a espécie *S. arenicola* pois partilham o mesmo ramo,

separados dos outros. Embora pertençam ao mesmo grupo da espécie *S. tropica* na árvore filogenética, as restantes estirpes PTM# não formam nenhum subgrupo com esta espécie.



**Figura 3. 5**– Árvore filogenética de distâncias utilizando o método *Neighbour-joining* que relaciona as sequências do gene 16S rRNA das estirpes PTM-44, 60, 78, 89, 93, 96, 99, 114, 115 e 325 e as sequências com maior identidade calculadas pela ferramenta Blast com a base de dados da NCBI (no máximo com quatro estirpes por género). Os nomes das espécies são seguidos pelos seus números de acesso (entre parêntesis). O alinhamento foi feito com um valor de “*Bootstrap*” calculado de 1000 repetições. As espécies *Propionibacterium propionicus* e *Streptomyces avermitilis* foram utilizadas como grupo externo para enraizar a árvore.

Para compreender melhor a relação filogenética destas estirpes com o gênero *Salinispora* foi criada outra árvore filogenética (figura 3.6), desta vez com o alinhamento das sequências dos 10 PTM# em questão, com as sequências das espécies *S. arenicola*, *S. tropica* derivadas da comparação feita com a base de dados da NCBI e também com 17 sequências do gene 16S rRNA de *S. pacífica*, obtidas na base de dados de nucleótidos da NCBI (GenBank), com os respectivos números de acesso (entre parêntesis).

Nesta análise filogenética é possível observar que as estirpes PTM-78, 86, 89, 114, 115 e 325 formam um grupo distinto com a espécie *S. pacífica* (HQ642852), as estirpes PTM-93 e 44 formam, por sua vez, um grupo com a espécie *S. pacífica* (JX007978) enquanto, que a estirpe PTM-60 forma um ramo distinto com as espécies *S. pacífica* (HQ873947 e HQ642851), mostrando assim a sua proximidade filogenética com a espécie *S. pacífica* e o afastamento das outras duas espécies do gênero *Salinispora*.

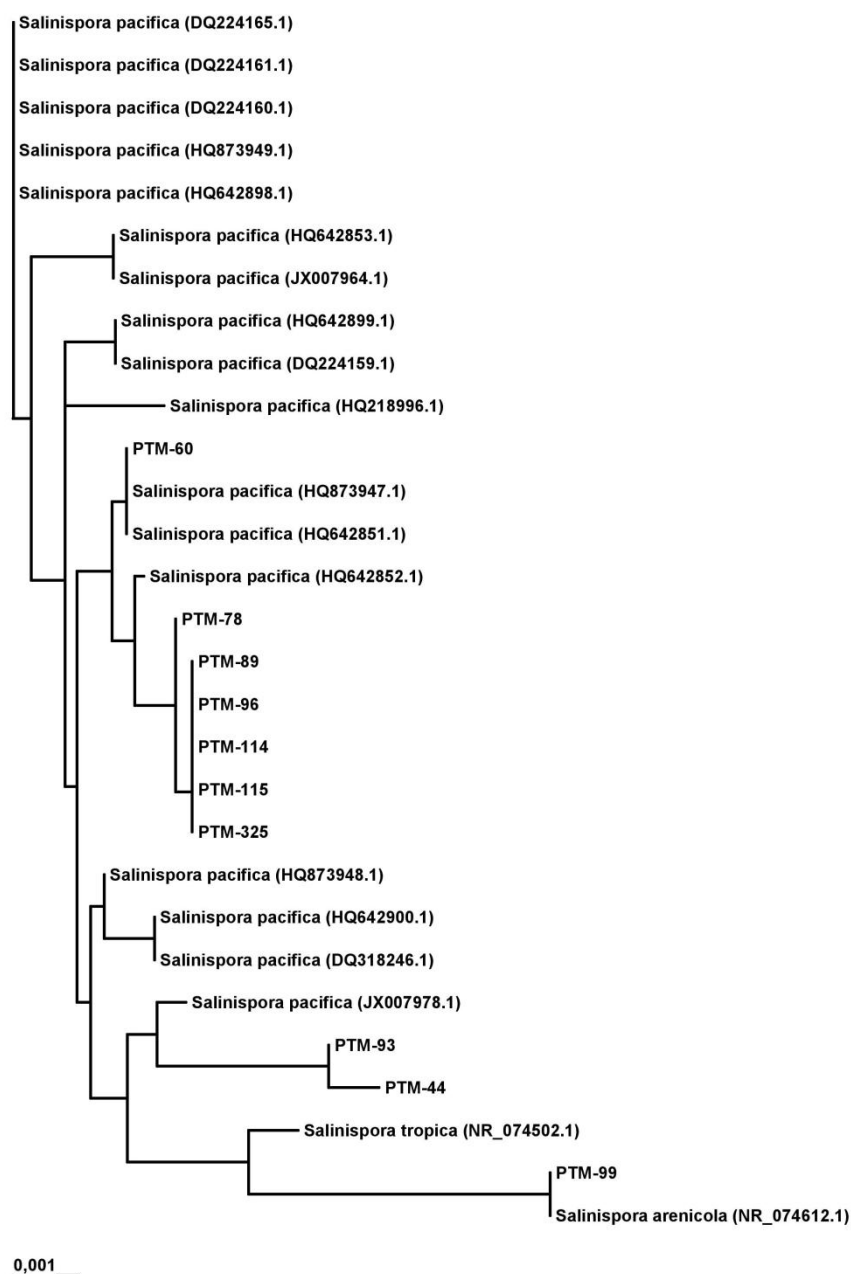


Figura 3. 6— Árvore filogenética de distâncias utilizando o método *Neighbour-joining* que relaciona as sequências do gene 16S rRNAAs das estirpes PTM-44, 60, 78, 89, 93, 96, 99, 114, 115 e 325 e as sequências representantes do género *Salinispora* com maior identidade calculadas pela ferramenta Blast com a base de dados da NCBI com adição de um grupo de 17 sequências da espécie *Salinispora pacifica*. Os nomes das espécies são seguidos pelos seus números de acesso (entre parêntesis). O alinhamento foi feito com um valor de “*Bootstrap*” calculado de 1000 repetições.

### 3.5 Avaliação do potencial biotecnológico dos extratos químicos (crudes)

Tendo como objetivo avaliar a concentração inibitória mínima e a atividade citotóxica dos crudes isolados, foram estudadas 126 estirpes (do conjunto de 124 estirpes selecionadas e das 20 estirpes adicionadas, referidas no rastreio de *Salinispora* sp.). As restantes 18 estirpes não foram estudadas por não terem sido obtidos os respetivos crudes durante o período de trabalhos experimentais desta dissertação.

#### 3.5.1 Avaliação da capacidade inibitória microbiana dos crudes

Dos 126 crudes testados cinco (PTM-29, 81, 99, 105 e 128) apresentaram atividade antimicrobiana, com valores de MIC entre  $2,5 \times 10^{-1}$  e  $7,8 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$  (ver tabela 3.2).

Foi possível observar que os crudes PTM-81 e PTM-128 são os que apresentam o valor de MIC mais elevado ( $7,8 \times 10^{-3} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), tanto para MRSA, como para VRE. O crude PTM-99 apresenta atividade inibitória apenas para MRSA com MIC de  $1,6 \times 10^{-2} \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

Nenhum dos crudes testados apresentou atividade inibitória na estirpe *Candida albicans*.

#### 3.5.2 Avaliação da capacidade citotóxica dos crudes

Esta avaliação foi feita com base nos crudes mais ou menos ativos, sendo os mais ativos os que apresentam uma redução de viabilidade celular superior a 80% na concentração de 19.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

Dos crudes testados oito apresentam atividade inibitória ao crescimento da linha celular HCT-116 (carcinoma do cólon humano).

Através dos resultados dos ensaios colorimétricos MTS (tabela 3.2) foi possível observar que o crude obtido da estirpe PTM-99 é o mais ativo contra as células do carcinoma do cólon humano, necessitando de uma concentração de 4.94  $\mu\text{g}/\text{ml}$  para inibir metade das células (IC50). Dos mais ativos para além do PTM-99 destacam-se os crudes derivados das estirpes PTM# 64, 34, 19 e 105, com valores de IC50 de 8.0, 9.7, 10.1 e 10.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respetivamente.

Na tabela 3.2 é possível observar que os crudes das estirpes PTM-99 e PTM-105 apresentam capacidade inibitória microbiana, bem como capacidade citotóxica para a linha celular HTC-116. A estirpe PTM-99 apresenta uma identidade de 98% com a espécie *S. arenicola* (NR\_074612.1), enquanto a PTM-105 apresenta uma identidade de 97% com *Micromonospora chaiyaphumensis* (NR\_041265.1).

**Tabela 3. 2**– Representação dos valores de MIC (em µg/µL) dos crudes ativos, para *Staphylococcus aureus* COL (MRSA, “Methicillin resistant *S. aureus*) e *Enterococcus faecium* EF82 (VRE, “Vancomycin resistant *Enterococcus*) e valores de IC50 (em µg/ml ) para a linha celular HCT-116 (carcinoma do cólon humano).

Grupo filogenético (gênero)	Estirpes isoladas	Tipo de estirpe mais próxima (nº de acesso)	Identi. da sequência c/27F (%)	MIC (MRSA) µg/µl	MIC (VRE) µg/µl	IC50 µg/ml
<i>Streptomyces</i>	PTM-29	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (NR_041166.1)	97%	$6,3 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$	-
	PTM-34	<i>Streptomyces albus</i> (NR_102949.1)	97%	-	-	9,7
	PTM-63	<i>Streptomyces caelestis</i> (NR_026202.1)	98%	-	-	19,66
	PTM-19	<i>Streptomyces carpaticus</i> (NR_043814.1)	98%	-	-	10,07
	PTM-81	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (NR_041166.1)	97%	$7,8 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-3}$	-
<i>Micromonospora</i>	PTM-105	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> (NR_041265.1)	97%	$3,1 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-1}$	10,76
	PTM-128	<i>Micromonospora</i> sp. (NR_074416.1)	97%	$7,8 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-3}$	-
<i>Salinispora</i>	PTM-99	<i>Salinispora arenicola</i> (NR_074612.1) *	98%	$1,6 \times 10^{-2}$	-	4,94
-	PTM-64 <sup>a</sup>	p/seq.	-	-	-	8,01

\*esta estirpe apresenta similaridade no valor de 99% quando comparada com a sequência consenso.

<sup>a</sup> a estirpe PTM-64 não foi sequenciadas durante o período de trabalhos experimentais desta dissertação.

**Tabela 3. 3-** Lista das 87 estirpes identificadas usando as sequências do gene 16S rRNA (sequenciado com *primer* 27F), com descrição do habitat de onde foram isoladas e morfologia das estirpes, com valores de identidade em porcentagem <sup>a</sup>

Grupo filogenético (género)	Estirpes isoladas	Descrição do habitat e profundidade (m)	Morfologia (colônia, esporos, meio)	Sequência (pb)	Tipo de estirpe mais próxima (nº de acesso)	Identi. da sequência (%)
<i>Streptomyces</i>	PTM-029	Mar aberto, 728 m	Castanho, esporos brancos	1100	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (NR_041166.1)	<b>97%</b>
	PTM-129	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Preto	1100	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (NR_041166.1)	99%
	PTM-081	Areia superficial da costa rochosa, 12 m	Castanho, esporos brancos, meio castanho/amarelo	1100	<i>Streptomyces aculeolatus</i> (NR_041166.1)	<b>97%</b>
	PTM-017	Mar aberto, 728 m	Castanho, esporos beges	1100	<i>Streptomyces albus</i> (NR_102949.1)	99%
	PTM-034	Fora da costa rochosa, 13 m	Preto	930	<i>Streptomyces albus</i> (NR_102949.1)	<b>97%</b>
	PTM-039	Costa rochosa, 12 m	Castanho, esporos beges	1100	<i>Streptomyces albus</i> (NR_102949.1)	99%
	PTM-080	Costa rochosa, 12 m	Bege, esporos brancos	1100	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (NR_041079.1)	<b>96%</b>
	PTM-241	Costa rochosa, 10 m	Castanho, esporos cinza	1097	<i>Streptomyces anthocyanicus</i> (NR_041168.1)	99%
	PTM-154	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Bege, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces atrovirens</i> (NR_043508.1)	99%
	PTM-063	Costa rochosa, 12 m	Bege, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces caelestis</i> (NR_026202.1)	<b>98%</b>
	PTM-019	-	Castanho, esporos cinza, meio castanho	1100	<i>Streptomyces carpaticus</i> (NR_043814.1)	<b>98%</b>
	PTM-184	Fora da costa rochosa, 13 m	Castanho, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces coelicoflavus</i> (NR_041175.1)	<b>98%</b>
	PTM-127	Fora da costa rochosa, 13 m	Castanho, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces diastaticus</i> (NR_043486.1)	<b>98%</b>
	PTM-006	Rochoso com muita Diadema, 13 m	Castanho, esporos beges, meio castanho	1100	<i>Streptomyces diastaticus</i> (NR_041209.1)	<b>98%</b>
	PTM-023	Mar aberto, 728 m	Castanho, esporos beges	798	<i>Streptomyces diastaticus</i> (NR_041209.1)	<b>98%</b>
	PTM-037	Mar aberto, 576 m	Castanho, esporos beges	1100	<i>Streptomyces diastaticus</i> (NR_041209.1)	<b>97%</b>
	PTM-042	Rochoso com muita Diadema, 13 m	Laranja	1100	<i>Streptomyces diastaticus</i> (NR_041209.1)	<b>96%</b>
	PTM-116	Rochoso com muita Diadema, 13 m	Castanho, esporos brancos	1100	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> (NR_041424.1)	<b>97%</b>
	PTM-035	Mar aberto, 728 m	Bege, esporos beges, meio amarelo	1034	<i>Streptomyces drozdowiczii</i> (NR_041424.1)	<b>95%</b>
	PTM-147	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Bege, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces flavoviridis</i> (NR_041218.1)	99%
	PTM-142	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Bege, esporos brancos	1100	<i>Streptomyces flocculus</i> (NR_041100.1)	<b>96%</b>

Tabela 3.3 - Continuação

Grupo filogenético (gênero)	Estirpes isoladas	Descrição do habitat e profundidade (m)	Morfologia (colônia, esporos, meio)	Sequência (pb)	Tipo de estirpe mais próxima (nº de acesso)	Identi. da sequência (%)
<i>Streptomyces</i> (cont.)	PTM-075	Costa rochosa, 12 m	Bege, esporos beges	1100	<i>Streptomyces griseus</i> (NR_074787.1)	98%
	PTM-182	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Bege, esporos beges	1100	<i>Streptomyces griseus</i> (NR_074787.1)	99%
	PTM-118	Areia, 14 m	Bege/castanho, esporos beges	1100	<i>Streptomyces intermedius</i> (NR_041103.1)	99%
	PTM-046	Costa rochosa, 10 m	Castanho, esporos cinza, meio amarelo	1100	<i>Streptomyces lienomycini</i> (NR_042302.1)	99%
	PTM-125	Costa rochosa, 10 m	Bege, esporos cinza, meio amarelo	1100	<i>Streptomyces malachitospinus</i> (NR_041423.1)	98%
	PTM-133	Costa rochosa, 12 m	Esporos cinza escuros	1100	<i>Streptomyces malachitospinus</i> (NR_041423.1)	99%
	PTM-056	Costa rochosa, 12 m	Castanho, esporos brancos	1100	<i>Streptomyces mobaraensis</i> (NR_043830.1)	96%
	PTM-112	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Bege, esporos beges	1100	<i>Streptomyces rimosus</i> (NR_024762.1)	97%
	PTM-162	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 17 m	Bege, esporos beges	992	<i>Streptomyces rubidus</i> (NR_043245.1)	97%
	PTM-021	Costa rochosa, 10 m	Bege, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces</i> sp. (NR_042760.1)	98%
	PTM-136	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Bege, esporos beges	1100	<i>Streptomyces tanashiensis</i> (NR_043369.1)	97%
	PTM-124	Costa rochosa, 12 m	Bege, esporos cinza/brancos	1100	<i>Streptomyces tendae</i> (NR_025871.1)	98%
	PTM-010	Costa rochosa, 10 m	Vermelho, esporos brancos/cinza	357	<i>Streptomyces tricolor</i> (NR_041189.1)	98%
	PTM-003	Costa rochosa, 12 m	Vermelho, esporos brancos/cinza	875	<i>Streptomyces violaceolatus</i> (NR_027223.1)	98%
	PTM-083	Costa rochosa, manchas de areia, 18 m	Bege, esporos cinza	1100	<i>Streptomyces xantholiticus</i> (NR_041123.1)	97%
	PTM-121	Areia superficial da costa rochosa, 12 m	Esporos cinza	1100	<i>Streptomyces xiamenensis</i> (NR_044035.1)	98%
<i>Micromonospora</i>	PTM-014	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Preto	1100	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> (NR_041265.1)	98%
	PTM-105	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Castanho	1100	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> (NR_041265.1)	97%
	PTM-163	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 20 m	Preto	1100	<i>Micromonospora chaiyaphumensis</i> (NR_041265.1)	98%
	PTM-002	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Bege, esporos pretos	1100	<i>Micromonospora chalicea</i> (NR_036795.1)	98%
	PTM-008	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Castanho-escuro	997	<i>Micromonospora chalicea</i> (NR_036795.1)	98%
	PTM-011	Fora da praia arenosa, 924 m	Bege, esporos pretos	992	<i>Micromonospora citrea</i> (NR_044886.1)	98%
	PTM-013	Fora da praia arenosa, 924 m	Laranja, esporos pretos	1016	<i>Micromonospora citrea</i> (NR_044886.1)	96%
	PTM-207	Costa rochosa, 10 m	Bege	1100	<i>Micromonospora coxensis</i> (NR_041350.1)	96%



Tabela 3.3 - Continuação

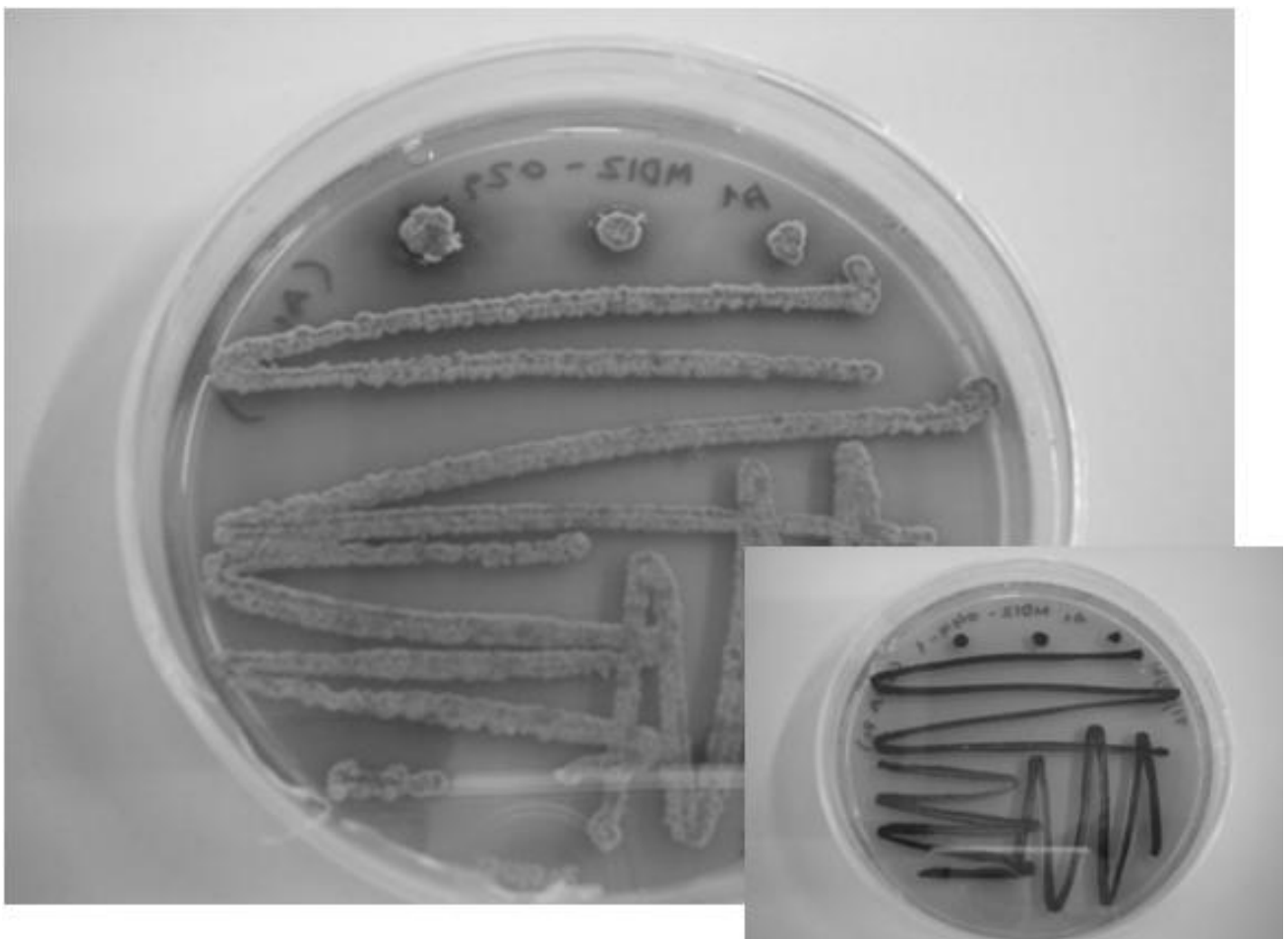
Grupo filogenético (gênero)	Estirpes isoladas	Descrição do habitat e profundidade (m)	Morfologia (colônia, esporos, meio)	Sequência (pb)	Tipo de estirpe mais próxima (nº de acesso)	Identi. da sequência (%)
<i>Micromonospora</i> (cont.)	PTM-283	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Laranja	1100	<i>Micromonospora olivasterospora</i> (NR_036966.1)	<b>94%</b>
	PTM-009	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Micromonospora</i> sp. (NR_074416.1)	<b>98%</b>
	PTM-047	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 10 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Micromonospora</i> sp. (NR_074416.1)	<b>98%</b>
	PTM-073	Rochoso com muita Diadema, 13 m	Laranja, esporos pretos, meio rosa	1100	<i>Micromonospora</i> sp. (NR_074416.1)	99%
	PTM-128	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Micromonospora</i> sp. (NR_074416.1)	<b>97%</b>
	PTM-166	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Preto	1100	<i>Micromonospora</i> sp. (NR_074416.1)	<b>98%</b>
<i>Salinispora</i>	PTM-099	Costa rochosa, 15 m	Laranja, meio de cultura escurecido	1100	<i>Salinispora arenicola</i> (NR_074612.1)	<b>98%</b>
	PTM-044	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Preto	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>96%</b>
	PTM-060	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>97%</b>
	PTM-078	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Laranja	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>97%</b>
	PTM-093	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>98%</b>
	PTM-114	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 16 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>98%</b>
	PTM-089	Costa rochosa, manchas de areia, 12 m	Laranja/salmão	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>97%</b>
	PTM-096	Costa rochosa, 15 m	Preto	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>96%</b>
	PTM-115	Costa rochosa, 12 m	Laranja, esporos pretos	993	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>98%</b>
	PTM-325	Costa rochosa, 10 m	Bege	1100	<i>Salinispora tropica</i> (NR_074502.1)	<b>98%</b>
<i>Nocardiopsis</i>	PTM-137	Mar aberto, 1310 m	Esporos cinza (compacto)	1100	<i>Nocardiopsis alba</i> (NR_044906.1)	<b>97%</b>
	PTM-309	Mar aberto, 728 m	Bege, esporos cinza, meio rosa	1100	<i>Nocardiopsis alba</i> (NR_044906.1)	<b>98%</b>
	PTM-321	Costa rochosa, manchas de areia, 10 m	Laranja, esporos pretos	1100	<i>Nocardiopsis alba</i> (NR_044906.1)	<b>97%</b>
	PTM-135	Costa rochosa, 12 m	Esporos brancos	1100	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> (NR_026339.1)	<b>98%</b>
	PTM-153	Costa rochosa, 10 m	Esporos brancos	1100	<i>Nocardiopsis dassonvillei</i> (NR_074635.1)	<b>98%</b>
	PTM-264	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Esporos brancos	1100	<i>Nocardiopsis exhalans</i> (NR_028017.1)	<b>97%</b>
<i>Verrucosíspora</i>	PTM-054	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Laranja	1100	<i>Verrucosíspora gifhornensis</i> (NR_026445.1)	<b>98%</b>

Tabela 3.3 - Continuação

Grupo filogenético (gênero)	Estirpes isoladas	Descrição do habitat e profundidade (m)	Morfologia (colônia, esporos, meio)	Sequência (pb)	Tipo de estirpe mais próxima (nº de acesso)	Identi. da sequência (%)
<i>Verrucosispora</i> (cont.)	PTM-195	Rochoso com muita Diadema, 13 m	Laranja	1100	<i>Verrucosispora gifhornensis</i> (NR_026445.1)	<b>98%</b>
	PTM-213	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Castanho	1100	<i>Verrucosispora gifhornensis</i> (NR_026445.1)	<b>98%</b>
<i>Kocuria</i>	PTM-040	Rochoso com muita Diadema, 13 m	Castanho, esporos beges, meio castanho	1100	<i>Kocuria palustris</i> (NR_026451.1)	<b>97%</b>
<i>Nonomurea</i>	PTM-079	Mar aberto, 180 m	Bege, esporos brancos	1100	<i>Nonomurea ferruginea</i> (NR_025996.1)	<b>97%</b>
<i>Brevibacterium</i>	PTM-123	Areia, 14 m	Bege/castanho, esporos beges	1100	<i>Brevibacterium epidermidis</i> (NR_029262.1)	<b>83%</b>
<i>Actinomadura</i>	PTM-088	Costa rochosa, manchas de areia, 18 m	Bege, esporos brancos	1100	<i>Actinomadura crenea</i> (NR_036898.1)	<b>97%</b>
<i>Micrococcus</i>	PTM-103	Areia superficial da costa rochosa, 12 m	Castanho, esporos brancos, meio castanho	1100	<i>Micrococcus luteus</i> (NR_075062.1)	<b>98%</b>
<i>Erythrobacter</i>	PTM-097	Costa rochosa, 15 m	Laranja	1100	<i>Erythrobacter citreus</i> (NR_028741.1)	<b>97%</b>
<i>Labrenzia</i>	PTM-130	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 16 m	Esporos beges	1100	<i>Labrenzia alba</i> (NR_042378.1)	<b>98%</b>
<i>Pseudomonas</i>	PTM-065	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Bege, esporos beges	1100	<i>Pseudomonas graminis</i> (NR_026395.1)	<b>97%</b>
<i>Brevundimonas</i>	PTM-033	Costa rochosa, 12 m	Laranja	1100	<i>Brevundimonas nasdae</i> (NR_028633.1)	<b>97%</b>
<i>Bacillus</i>	PTM-050	Areia superficial em profundidade da costa rochosa, 15 m	Amarelo	1100	<i>Bacillus pumilus</i> (NR_074977.1)	<b>97%</b>
	PTM-160	Costa rochosa, manchas de areia, 16 m	Laranja	1100	<i>Bacillus endophyticus</i> (NR_025122.1)	<b>97%</b>
	PTM-288	Fora da costa rochosa, 13 m	Laranja, esporos pretos, meio amarelo	1100	<i>Bacillus endophyticus</i> (NR_025122.1)	<b>97%</b>

<sup>a</sup> Quando as sequências partilham uma identidade  $\leq 98\%$  com a estirpe mais próxima o valor é marcado a negrito

## Capítulo 4. Discussão





## 4 Discussão

### 4.1 Isolamento de colónias morfológicamente semelhantes a actinomicetas

A evolução das cores, tanto das colónias como dos esporos, é um parâmetro a ter em atenção, pois pode levar a erros na caracterização morfológica, que por sua vez pode levar a erros nos critérios de seleção, no caso de se pretender estudar um subgrupo de estirpes representativas da diversidade total da coleção de estirpes. É importante assim acompanhar estas evoluções ao longo do tempo.

### 4.2 Rastreio de colónias morfológicamente semelhantes ao género *Salinispora*

Através do método que avalia a sensibilidade de ausência de sal no meio de cultura, foi possível selecionar seis estirpes (PTM# 44, 60, 78, 93, 114 e 115) (figura 3.3) das dez estirpes identificadas neste trabalho com semelhança ao género *Salinispora* (tabela 3.1), que de outro modo poderiam não ter sido selecionadas com a aplicação dos critérios de seleção, pois a escolha das estirpes apenas teve em consideração a sua morfologia, sendo depois escolhidas aleatoriamente dentro de cada grupo de morfologias.

Duas outras estirpes de actinomicetas mostraram ser sensíveis à ausência de sal. Estas estirpes têm valores de identidade máximos com as espécies *Verrucosipora gifhornensis* e *Nocardiopsis alba* (PTM-195 e 321 respetivamente), ambas com valores  $\leq 98\%$ . Estes dois géneros foram reportados anteriormente como sendo espécies nativas marinhas [9], [15] mas não existe informação sobre a necessidade de NaCl no seu crescimento. Estes factos poderão significar uma divergência taxonómica dentro destes dois géneros, respetivamente, sugerindo novas espécies.

### 4.3 Identificação taxonómica das estirpes a partir da sequenciação do gene 16S rRNA.

Neste trabalho, a partir da sequenciação do gene 16S rRNA de 82 estirpes foi possível identificar semelhanças com vários géneros da ordem *Actinomycetales*, como os géneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Salinispora*, *Nocardiopsis*, *Verrucosipora*, *Kocuria*, *Nonomuraea*, *Brevibacterium*, *Actinomadura* e *Micrococcus*.

Os géneros *Streptomyces* e *Micromonospora* são os mais representados, com 37 estirpes (43%) e 14 estirpes (19%) respetivamente. Estudos semelhantes também mostram esta tendência noutros locais de amostragem [9], [47].

Representantes dos géneros *Streptomyces* e *Micromonospora* foram isolados, para este trabalho, de amostras recolhidas a profundidades entre os 10 e os 20 metros, mas também a profundidades superiores, entre 728 e 924 metros. Este facto contribui para o afastamento da hipótese de uma origem terrestre, tratando-se assim de espécies nativas de ecossistemas marinhos.

Como foi referido anteriormente foram isoladas estirpes representantes do género *Salinispora*, sendo o terceiro grupo mais representado nestas amostras com 10 estirpes (13%).

Existem relatos de isolamentos de espécies de *Salinispora* em vários locais do globo, perceptível na figura 1.1. No entanto não houve, até à data, relatos de isolamentos deste género em toda a zona Este do Oceano Atlântico. Numa primeira análise do *blast* estas estirpes foram identificadas como *S. tropica* e *S. arenicola* sendo a primeira a mais representada com nove estirpes. Numa análise subsequente, descrita em detalhe no ponto 4.4, revelou que as estirpes identificadas inicialmente como *S. tropica* são mais próximas filogeneticamente da espécie *S. pacifica*.

Nas estirpes isoladas neste trabalho também se encontram representantes de outros géneros de actinomicetas, para além dos três primeiros, são eles os géneros *Nocardiopsis*, *Verrucosisspora*, *Kocuria*, *Nonomuraea*, *Brevibacterium*, *Actinomadura* e *Micrococcus*. Estes géneros possuem estirpes já isoladas anteriormente de ambientes marinhos [11].

Muitos dos valores de similaridade presentes na tabela 3.3 apresentam percentagens  $\leq 98\%$  podendo indicar a descoberta de novas espécies. Para confirmar esta hipótese, seria necessário, nomeadamente, a sequenciação do gene 16S rRNA com ambos os *primers*, *forward* e *reverse*, e a realização de estudos adicionais de identificação taxonómica como a sequência de outros genes *housekeeping* e estudos de hibridação DNA-DNA, referida anteriormente [28].

#### **4.4 Análise filogenética de estirpes com identidade máxima com o género *Salinispora***

O isolamento de estirpes do género *Salinispora* na zona Este do Oceano Atlântico, pela primeira vez, aumenta o interesse deste trabalho. Tornou-se assim importante fundamentar o seu conhecimento filogenético. A análise filogenética com recurso a árvores filogenéticas constitui uma boa ferramenta neste contexto.

A árvore filogenética, representada na figura 3.5, mostra a formação de um ramo entre as 10 estirpes (PTM# 44, 60, 78, 93, 96, 99, 114, 115 e 325) e as espécies de *S. tropica* e *S. arenicola*, separando-as dos restantes membros da família *Micromonosporaceae*, o que confirma a análise anterior de identidade taxonómica.

Na continuação da identificação taxonómica destas estirpes, foi pedida uma segunda análise das sequências ao grupo de investigação da SIO (Scripps Institution of Oceanography)

da Universidade da Califórnia, San Diego, coordenado pelo Dr. Paul Jensen. Segundo os seus resultados (dados não mostrados neste trabalho) existem representantes das estirpes *S. arenicola* e *S. pacifica* nas 10 estirpes isoladas em questão, não existindo estirpes representantes de *S. tropica*.

É reconhecido noutros trabalhos que as espécies de *S. tropica* e *S. pacifica* se relacionam filogeneticamente formando um ramo separado da espécie *S. arenicola*[33].

O facto de as estirpes, *S. tropica* e *S. pacifica* serem próximas filogeneticamente, poderá explicar as diferenças nas conclusões sobre a taxonomia destas estirpes entre os resultados obtidos no blast e a análise mais detalhada efetuada pela equipa americana.

Para perceber a proximidade filogenética das espécies *S. tropica* e *S. pacifica* foi construída uma árvore filogenética (figura 3.6) de forma a relacionar as sequências das 10 estirpes em questão com sequências das três espécies *Salinispora* sp.

Através desta árvore é possível observar a relação entre a estirpe PTM-99 com *S. arenicola*, que confirma as análises anteriores, a proximidade filogenética entre as restantes estirpes isoladas, com espécies de *S. pacifica* e a sua divergência com a espécie *S. tropica*.

Nesta análise também foi possível observar que as estirpes PTM# 44, 60, 78, 89, 93, 96, 114, 115 e 325 apresentam ramos filogenéticos distintos dentro do grupo de *S. pacifica*, o que sugere uma evolução de diferentes tipos dentro da espécie.

As estirpes PTM-44 e 93 formam um ramo com a estirpe *S. pacifica* (JX007978.1). Este grupo distancia-se filogeneticamente das restantes estirpes formando claramente um tipo diferente de *S. pacifica*. O mesmo acontece com as PTM# 89, 96, 114, 115, 325 e 78 e a estirpe *S. pacifica* (HQ642852.1). Observa-se ainda a existência de um terceiro tipo formado pela estirpe PTM-60 e as estirpes *S. pacifica* (HQ873947.1) e *S. pacifica* (HQ642851.1).

Esta análise mostra assim que as estirpes, *S. arenicola* e *S. pacifica* fazem parte da comunidade de actinomicetas nativos dos fundos marinhos ao largo do arquipélago da Madeira, o que representa uma novidade nos locais de ocorrência documentados da espécie *S. pacifica* no Oceano Atlântico até à data. Também a existência de três tipos distintos da espécie *S. pacifica*, tornam estes resultados promissores, uma vez que diferentes tipos desta espécie sugerem metabolitos secundários diferentes, com potencial para novos fármacos.

## 4.5 Avaliação do potencial biotecnológico dos extratos químicos (crudes)

Como foi referido anteriormente neste trabalho foram avaliados 126 crudes, obtidos das estirpes isoladas, quanto à sua capacidade inibitória contra *Staphylococcus aureus* COL (MRSA, “Methicillin resistant *S. aureus*), *Enterococcus faecium* EF82 (VRE, “Vancomycin resistant *Enterococcus*), *Candida albicans* 3436 (da coleção internacional PYCC.) e em linhas celulares HCT-116 (carcinoma do cólon humano).

### 4.5.1 Avaliação da capacidade inibitória microbiana dos crudes

Dos crudes avaliados, cinco apresentaram atividade inibitória para MRSA e VRE, são eles os PTM# 29, 81, 105 e 128, o crude PTM-099 apenas apresenta atividade inibitória para MRSA (tabela 3.2).

Os crudes PTM# 29 e 81 apresentam valores mínimos inibitórios de 63 e 7.8 µg/ml, respetivamente, tanto para MRSA como para VRE. As estirpes de onde se obtiveram estes crudes apresentam entidade máxima com a espécie *Streptomyces aculeolatus*, com valores de 97% (tabela 3.2). Esta espécie é conhecida pela sua capacidade de produção de compostos bioativos, como nupuradiomicina [48]. Este composto foi reportado como um potencial terapêutico para tratamentos de infeção por MRSA com valores de MIC de 1-2 µg/ml [55].

Tanto a estirpe PTM-128 e a 105 foram identificadas com 97% de semelhança com as espécies *Micromonospora* sp. e *Micromonospora chalybathumensis* (tabela 3.2), respetivamente, ambas pertencentes ao género *Micromonospora*. O crude PTM-128 obteve valores de MIC de 7.8 µg/ml tanto para MRSA como para VRE. O PTM-105 por outro lado obteve valores de MIC de 31 µg/ml para MRSA e 130 µg/ml para VRE. Este género é conhecido por produzir antibióticos, como as citreamicinas, derivadas da espécie *M. citrea*. Este tipo de antibiótico como a neocitramicina mostra um potencial inibitório contra MRSA e VRE com valores de MIC entre 0.12-0.5 µg/ml para estirpes de MRSA e 0.006-0.25 µg/ml para estirpes de VRE [49], [50].

Quanto ao crude PTM-99 apenas mostra atividade inibitória contra MRSA com valores de MIC de 16 µg/ml, a estirpe do qual foi obtido foi identificada com 99% de semelhança com a espécie *S. arenicola* (tabela 3.1). Esta espécie foi reportada como produtora do composto antibacteriano arenimicina, este antibiótico foi confirmado como inibidor de MRSA e VRE com valores de MIC entre 0.05-1.03 µg/ml para estirpes de MRSA e > 8 µg/ml para VRE [38].

Todas estas estirpes foram identificadas como semelhantes a géneros de actinomicetas já reportados como tendo atividade antibacterianas, apresentando valores de MIC inferiores aos dos crudes testados. É necessário realçar que os valores de MIC reportados na literatura foram obtidos dos compostos químicos isolados e purificados, ao contrário dos valores de MIC obtidos neste trabalho, pois foram obtidos de extratos brutos.



Para uma comparação real com os compostos referidos na literatura e para perceber se esta capacidade inibitória é derivada de novos antibióticos terá de se fazer um fracionamento destes crudes, elucidando depois a estrutura dos compostos em questão.

#### 4.5.2 Avaliação da capacidade citotóxica dos crudes

Destes crudes seis mostraram atividade inibitória contra a linha celular HCT-116 (tabela 3.2). Através dos resultados pode-se observar que três crudes com atividade citotóxica foram obtidos de estirpes identificadas entre 97 e 98% de semelhança com espécies do género *Streptomyces*, são elas a PTM-19, 34 e 63 que se identificam com *S. carpaticus*, *S. albus* e *S. caelestis* respetivamente. Estas espécies são conhecidas por produzir compostos como a salinomicina com atividade citotóxica contra células estaminais cancerígenas [51] ou as actinopironas que são um tipo de pironas que possuem atividade antitumoral [52].

O crude obtido da estirpe PTM-105 para além de apresentar atividade antibacteriana também possui atividade citotóxica, esta estirpe, como foi referido anteriormente, foi identificada como 97% de semelhança com a espécie *Micromonospora chalybiumensis*. Na literatura vem referido que outras espécies do género *Micromonospora* produzem compostos citotóxicos como *Micromonospora lupini* que foi reportado como produtor de antraquinonas, como a lupinacidina A, B e C [53], [54]. Para a espécie *M. chalybiumensis* em concreto não se encontram relatórios da produção de compostos citotóxicos na literatura.

Quanto à estirpe PTM-99 identificada com 99% de semelhança com *S. arenicola*, o seu crude também apresenta atividade citotóxica, o género *Salinispora* é bem conhecido pela produção de vários compostos citotóxicos e anticancerígenos, como salinosporamida A, B e C, salinictal, arenimicina, salinipironas A e B, Arenicolídeos A B e C [34], [37].

De todos os resultados apresentados na avaliação do potencial inibitório dos crudes, destacam-se os crudes obtidos das estirpes PTM-81 e 128 que apresentam uma maior capacidade inibitória, tanto para MRSA como para VRE, quanto à capacidade citotóxica destacam-se os crudes obtidos das estirpes PTM-19, 34 e 64 com a maior atividade citotóxica.

Em relação aos crudes obtidos das estirpes PTM-99 e 105 destacam-se pelo espectro de ação, pois possuem atividade antibacteriana e citotóxica em simultâneo.

À semelhança da análise anterior de avaliação da capacidade inibitória microbiana, a possibilidade da capacidade citotóxica destes crudes ser derivada de novos compostos bioativos, terá de ser confirmada pelo fracionamento do extrato bruto.



## Capítulo 5. Conclusões e perspectivas futuras





## 5 Conclusão e perspectivas futuras

Com este trabalho foi possível a obtenção de 333 actinomicetas isolados de sedimentos recolhidos ao largo do arquipélago da Madeira, a avaliação da sua biodiversidade e a avaliação do potencial biotecnológico dos seus compostos químicos (crudes). No que respeita à avaliação da biodiversidade da comunidade de actinomicetas é possível concluir que o género *Streptomyces* possui a maior percentagem de ocorrência (49%), seguido dos géneros *Micromonospora*, *Salinispora*, *Nocardiopsis*, *Verrucosipora*, *Kocuria*, *Nonomuraea*, *Brevibacterium*, *Actinomadura* e *Micrococcus*.

A utilização do método de distância *neighbour-joining*, na construção de árvores filogenéticas, auxiliou a identificação taxonómica do género *Salinispora*. Com esta análise foi possível verificar a ocorrência das espécies de *S. arenicola* e *S. pacifica* nesta zona do Oceano Atlântico. Bem como a existência de diferentes tipos de *S. pacifica*.

Quanto à avaliação do potencial biotecnológico das estirpes, cinco estirpes produziram crudes que apresentaram atividade biológica contra MRSA e VRE, e oito estirpes contra linhas celulares HCT-116. As estirpes que evidenciam potencial interesse biotecnológico pertencem aos géneros *Streptomyces*, *Micromonospora* e *Salinispora*, respetivamente. Destas, duas apresentaram diversidade bioativa, com atividade antimicrobiana e atividade citotóxica em simultâneo, nomeadamente as estirpes PTM-99 e 105 pertencendo aos géneros *Salinispora* e *Micromonospora*, respetivamente.

Estes resultados revelam-se bastante promissores: o estudo permitiu a obtenção de estirpes de actinomicetas com muito interesse do ponto de vista biotecnológico, que apresentam potencial para a obtenção de novos compostos bioativos, com vista à produção de novos fármacos. Trabalho a realizar futuramente.



## Referências Bibliográficas







## Referências Bibliográficas

- [1] T. J. Mincer, P. R. Jensen, C. A. Kauffman, and W. Fenical, "Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68, no. 10, pp. 5005–5011, 2002.
- [2] P. R. Jensen, T. J. Mincer, P. G. Williams, and W. Fenical, "Marine actinomycete diversity and natural product discovery.," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 87, no. 1, pp. 43–8, Jan. 2005.
- [3] A. T. Bull, A. C. Ward, and M. Goodfellow, "Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift.," *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 64, no. 3, pp. 573–606, Sep. 2000.
- [4] K. S. Lam, "Discovery of novel metabolites from marine actinomycetes.," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 9, no. 3, pp. 245–51, Jun. 2006.
- [5] P. R. Jensen, E. Gontang, C. Mafnas, T. J. Mincer, and W. Fenical, "Culturable marine actinomycete diversity from tropical Pacific Ocean sediments.," *Environmental Microbiology*, vol. 7, no. 7, pp. 1039–48, Jul. 2005.
- [6] W. Fenical and P. R. Jensen, "Developing a new resource for drug discovery: marine actinomycete bacteria.," *Nature chemical biology*, vol. 2, no. 12, pp. 666–73, Dec. 2006.
- [7] P. R. Jensen and C. Mafnas, "Biogeography of the marine actinomycete *Salinispora*.," *Environmental Microbiology*, vol. 8, no. 11, pp. 1881–8, Nov. 2006.
- [8] L. a Maldonado, W. Fenical, P. R. Jensen, C. a Kauffman, T. J. Mincer, A. C. Ward, A. T. Bull, and M. Goodfellow, "*Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family *Micromonosporaceae*.," *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, vol. 55, no. Pt 5, pp. 1759–66, Sep. 2005.
- [9] H. Bredholdt, O. a Galatenko, K. Engelhardt, E. Fjaervik, L. P. Terekhova, and S. B. Zotchev, "Rare actinomycete bacteria from the shallow water sediments of the Trondheim fjord, Norway: isolation, diversity and biological activity.," *Environmental Microbiology*, vol. 9, no. 11, pp. 2756–64, Nov. 2007.
- [10] S. Das, P. Lyla, and S. Khan, "Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives," *Current Science*, vol. 90, no. 10, pp. 1325–1335, 2006.
- [11] R. Subramani and W. Aalbersberg, "Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites.," *Microbiological Research*, vol. 167, no. 10, pp. 571–80, Dec. 2012.
- [12] T. J. Mincer, W. Fenical, and P. R. Jensen, "Culture-dependent and culture-independent diversity within the obligate marine actinomycete genus *Salinispora*," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 11, pp. 7019–7028, 2005.
- [13] L. A. Maldonado, J. E. M. Stach, W. Pathom-aree, A. C. Ward, A. T. Bull, and M. Goodfellow, "Diversity of cultivable actinobacteria in geographically widespread marine sediments.," *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 87, no. 1, pp. 11–8, Jan. 2005.
- [14] A. Bruns, H. Philipp, H. Cypionka, and T. Brinkhoff, "*Aeromicrobium marinum* sp. nov., an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden Sea,"

*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, no. 6, pp. 1917–1923, Nov. 2003.

- [15] J. Riedlinger, A. Reicke, and H. Zöhner, “Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucospora* strain AB-18-032,” *The Journal of Antibiotics*, vol. 57, no. 4, pp. 271–279, 2004.
- [16] S. K. Han, “*Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 53, no. 6, pp. 2061–2066, Nov. 2003.
- [17] R. H. Felting, G. O. Buchanan, T. J. Mincer, C. A. Kauffman, P. R. Jensen, W. Fenical, and D. John, “Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinospira*,” *Angewandte Chemie Int. Ed.*, vol. 42, no. 3, pp. 355–357, 2003.
- [18] M. Goodfellow and S. T. Williams, “Ecology of actinomycetes,” *Annual Review of Microbiology*, vol. 37, no. 41, pp. 189–216, Jan. 1983.
- [19] S. Ramesh and A. M. Rajesh, “Characterization of a thermostable alkaline protease produced by marine *Streptomyces fungicidicus* MML1614,” *Bioprocess Biosyst Eng*, vol. 32, pp. 791–800, 2009.
- [20] J. Berdy, “Bioactive microbial metabolites,” *The Journal of Antibiotics*, vol. 58, no. 1, pp. 1–26, 2005.
- [21] M. Khanna, R. Solanki, and R. Lal, “Selective isolation of rare actinomycetes producing novel antimicrobial compounds,” *Int J Adv Biotechnol Res*, vol. 2, no. 3, pp. 357–375, 2011.
- [22] M. Hayakawa, “Studies on the isolation and distribution of rare actinomycetes in soil,” *Actinomycetologia*, vol. 22, no. 1, pp. 12–19, 2008.
- [23] J. Kennedy, B. Flemer, S. a Jackson, D. P. H. Lejon, J. P. Morrissey, F. O’Gara, and A. D. W. Dobson, “Marine metagenomics: new tools for the study and exploitation of marine microbial metabolism,” *Marine drugs*, vol. 8, no. 3, pp. 608–28, Jan. 2010.
- [24] A. Bull, J. Stach, A. Ward, and M. Goodfellow, “Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, pp. 65–79, 2005.
- [25] P. Monciardini and M. Sosio, “New PCR primers for the selective amplification of 16S rDNA from different groups of actinomycetes1,” *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 42, no. 8, pp. 419–429, 2002.
- [26] B. Wawrik and L. Kerkhof, “Identification of unique type II polyketide synthase genes in soil,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 71, no. 5, pp. 2232–2238, 2005.
- [27] M. Das, T. V Royer, and L. G. Leff, “Diversity of fungi, bacteria, and actinomycetes on leaves decomposing in a stream,” *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 3, pp. 756–67, Feb. 2007.
- [28] J. M. Janda and S. L. Abbott, “16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls,” *Journal of Clinical Microbiology*, vol. 45, no. 9, pp. 2761–4, Sep. 2007.

- [29] S. Sanchez and A. L. Demain, "Metabolic regulation of fermentation processes," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 31, no. 7, pp. 895–906, Dec. 2002.
- [30] H. Bode, B. Bethe, R. Höfs, and A. Zeeck, "Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity," *Chem Bio Chem*, vol. 3, no. 7, pp. 619–627, 2002.
- [31] J. Martín and A. Demain, "Control of antibiotic biosynthesis.," *Microbiological Reviews*, vol. 44, no. 2, pp. 230–251, 1980.
- [32] G. D. Wright and A. D. Sutherland, "New strategies for combating multidrug-resistant bacteria.," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 260–7, Jun. 2007.
- [33] K. C. Freel, A. Edlund, and P. R. Jensen, "Microdiversity and evidence for high dispersal rates in the marine actinomycete '*Salinispora pacifica*'.," *Environmental Microbiology*, vol. 14, no. 2, pp. 480–93, Feb. 2012.
- [34] P. R. Jensen, P. G. Williams, D.-C. Oh, L. Zeigler, and W. Fenical, "Species-specific secondary metabolite production in marine actinomycetes of the genus *Salinispora*.," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 4, pp. 1146–52, Feb. 2007.
- [35] P. G. Williams, G. O. Buchanan, R. H. Felting, C. a Kauffman, P. R. Jensen, and W. Fenical, "New cytotoxic salinosporamides from the marine Actinomycete *Salinispora tropica*.," *The Journal of organic chemistry*, vol. 70, no. 16, pp. 6196–203, Aug. 2005.
- [36] D.-C. Oh, E. a Gontang, C. a Kauffman, P. R. Jensen, and W. Fenical, "Salinipyrones and pacificanones, mixed-precursor polyketides from the marine actinomycete *Salinispora pacifica*.," *Journal of natural products*, vol. 71, no. 4, pp. 570–5, Apr. 2008.
- [37] P. Williams and E. Miller, "Arenicolides AC, 26-membered ring macrolides from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*," *The Journal of Organic Chemistry*, vol. 72, no. 14, pp. 5025–5034, 2007.
- [38] R. Asolkar and T. Kirkland, "Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin-and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*," *Journal of Antibiotics*, vol. 63, no. 1, pp. 37–39, 2010.
- [39] "EMEPC - Estrutura de Missão para a Extensão da Plataforma Continental." [Online]. Available: [http://www.emepc.pt/index.php?option=com\\_content&task=view&id=1&Itemid=55](http://www.emepc.pt/index.php?option=com_content&task=view&id=1&Itemid=55).
- [40] "Campanhas M@rBis - Sistema de Informação para a Biodiversidade Marinha." [Online]. Available: [http://www.campanhasmarbis.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=137&Itemid=131](http://www.campanhasmarbis.org/index.php?option=com_content&task=view&id=137&Itemid=131).
- [41] M. Calha, "Cluster do Mar - Investigação, Desenvolvimento & Inovação," *Cluster do Mar*. [Online]. Available: <http://www.clusterdomar.com/index.php/temas/i-d>.
- [42] P. R. Jensen, R. Dwight, and W. Fenical, "Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments.," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 57, no. 4, pp. 1102–8, Apr. 1991.
- [43] M. Wikler, F. Cockerill, W. Craig, M. Dudley, G. Eliopoulos, D. Hecht, J. Hindler, D. Low, D. Sheehan, F. Tenover, J. Turnidge, M. Weinstein, B. Zimmer, M. Ferrano, and J. Swenson, "Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: seventeenth informational supplement," *M100-S17*, vol. 27, no. 1, pp. 1–177, 2007.

- [44] M. Sousa, I. Sanches, W. Belkum, W. Leeuwen, and H. Lencastre, "Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from Portuguese hospitals by multiple genotyping methods," *Microbial Drug Resistance*, vol. 2, no. 3, pp. 331–341, 1996.
- [45] E. a Gontang, W. Fenical, and P. R. Jensen, "Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments.," *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 73, no. 10, pp. 3272–82, May 2007.
- [46] F. Sanger and S. Nicklen, "DNA sequencing with chain-terminating," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 74, no. 12, pp. 5463–5467, 1977.
- [47] A. Prieto-Davó, W. Fenical, and P. Jensen, "Comparative actinomycete diversity in marine sediments," *Aquatic Microbial Ecology*, vol. 52, no. 6, pp. 1–11, Jun. 2008.
- [48] J. M. Winter, M. C. Moffitt, E. Zazopoulos, J. B. McAlpine, P. C. Dorrestein, and B. S. Moore, "Molecular basis for chloronium-mediated meroterpene cyclization: cloning, sequencing, and heterologous expression of the napyradiomycin biosynthetic gene cluster.," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, no. 22, pp. 16362–8, Jun. 2007.
- [49] G. Carter and J. Nietsche, "Citreamicins, novel antibiotics from *Micromonospora citrea*: isolation, characterization, and structure determination.," *The Journal of Antibiotics*, vol. 43, no. 5, pp. 504–512, 1990.
- [50] A. Peoples and Q. Zhang, "Neocitreamicins I and II, Novel Antibiotics with Activity Against Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* and Vancomycin-Resistant Enterococci," *Journal of Antibiotics*, vol. 61, no. 7, pp. 457–463, 2008.
- [51] C. Naujokat and R. Steinhart, "Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells," *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, vol. 2012, p. 950658, Jan. 2012.
- [52] C. Schleissner and M. Pérez, "Antitumor Actinopyranones Produced by *Streptomyces albus* POR-04-15-053 Isolated from a Marine Sediment," *Journal of Natural Products*, vol. 74, no. 6, pp. 1590–1596, 2011.
- [53] Y. Igarashi, M. E. Trujillo, E. Martínez-Molina, S. Yanase, S. Miyanaga, T. Obata, H. Sakurai, I. Saiki, T. Fujita, and T. Furumai, "Antitumor anthraquinones from an endophytic actinomycete *Micromonospora lupini* sp. nov.," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, vol. 17, no. 13, pp. 3702–5, Jul. 2007.
- [54] Y. Igarashi, S. Yanase, K. Sugimoto, M. Enomoto, S. Miyanaga, M. E. Trujillo, I. Saiki, and S. Kuwahara, "Lupinacidin C, an inhibitor of tumor cell invasion from *Micromonospora lupini*," *Journal of Natural Products*, vol. 74, no. 4, pp. 862–5, Apr. 2011.
- [55] N. M. Haste, L. Farnaes, V. R. Perera, W. Fenical, V. Nizet and M. E. Hensler, "Bactericidal kinetics of marine-derived napyradiomycins against contemporary methicillin-resistant", *Marine drugs*, vol. 9, no. 4, pp. 680–89, Apr. 2011

## Anexos





## Anexos

**Anexo 1. 1** – Lista de estirpes seleccionadas através da aplicação dos critérios de seleção (124 estirpes) mais as estirpes identificadas inicialmente pertencendo ao género *Salinispora* (20 estirpes); valores de MIC dos crudes para MRSA e VRE; valores de IC50; p/a – códigos de estirpe por atribuir por estarem em fase de purificação; si – sem inibição celular; \* estirpes com código atribuído em fase de purificação.

Código de estirpe	Nome da estirpe	Meio/método	Morfologia (colónia, esporos, meio)	MIC (MRSA) µg/µl	MIC (VRE) µg/µl	IC50 µg/ml
p/a	MD12-511-1-A	SWAS2	amarela	-	-	-
p/a	MD12-565-1-B	SWAP1	amarela, esporos brancos	-	-	-
p/a	MD12-565-1-C	SWAP1	amarela, esporos brancos	-	-	-
p/a	MD12-049-1-A-1-A-1-A	1/2A1S1	bege, esporos rosa	-	-	-
p/a	MD12-021-1-A-1-A	SWAS1	rosa	-	-	-
p/a	MD12-410-2	SWAP1	laranja	-	-	-
p/a	MD12-565-1	1/2A1S2	laranja	-	-	-
p/a	MD12-638-1	SWAS2	laranja	-	-	-
p/a	MD12-362-1	1/2A1S2	laranja, esporos pretos	-	-	-
p/a	MD12-555-1	A1P1	laranja, esporos pretos	-	-	-
p/a	MD12-558-1	1/2A1S2	laranja, esporos pretos	-	-	-
PTM-002	MD12-105-3	SWAS2	bege, esporos pretos	si	si	si
PTM-003	MD12-514-1	A1P1	vermelha, esporos brancos/cinza	si	si	si
PTM-004	MD12-053-2	SWAP1	preto	si	si	si
PTM-005	MD12-029-2	A1S1	castanha, esporos cinza, meio castanho	si	si	si
PTM-006	MD12-063-1	SWAP1	castanha, esporos beges, meio castanho	si	si	si
PTM-007	MD12-029-1	A1P1	vermelho, esporos brancos/cinza	si	si	si
PTM-008	MD12-111-1	SWAP1	castanha escura	si	si	si
PTM-009	MD12-114-1	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
PTM-010	MD12-552-1	A1P1	vermelho, esporos brancos/cinza	si	si	si
PTM-011	MD12-209-2	SWAP1	bege, esporos pretos	si	si	si
PTM-012	MD12-399-3	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
PTM-013	MD12-209-1	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
PTM-014	MD12-254-2	SWAP1	preta	si	si	si
PTM-015	MD12-559-1-A	A1P1	bege, esporos brancos, meio amarelo	si	si	si
PTM-016	MD12-303-2	SWAP1	preta	si	si	si
PTM-017	MD12-393-2	SWAP1	castanha, esporos beges	si	si	si
PTM-018	MD12-463-2	SWAP1	castanha, esporos beges	si	si	si
PTM-019	MD12-661-1	A1P1	castanha, esporos cinza, meio castanho	si	si	10,07
PTM-021	MD12-549-2	A1P1	bege, esporos cinza	si	si	si
PTM-023	MD12-393-1	SWAP1	castanha, esporos beges	si	si	si
PTM-024*	MD12-430-2	SWAP1	laranja, esporos pretos	-	-	-
PTM-029	MD12-395-2	SWAP1	castanha, esporos brancos	6,3x10 <sup>-2</sup>	6,3x10 <sup>-2</sup>	si

<b>PTM-031</b>	MD12-523-2-A	A1S2	laranja, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-033</b>	MD12-558-1-A	A1P1	laranja	si	si	si
<b>PTM-034</b>	MD12-451-3	SWAS2	preta	si	si	9,7
<b>PTM-035</b>	MD12-394-4	SWAP1	bege, esporos beges, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-037</b>	MD12-499-1-A	A1P1	castanha, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-039</b>	MD12-508-1-A	A1P1	castanha, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-040</b>	MD12-073-1	A1P1	castanha, esporos beges, meio castanho	si	si	si
<b>PTM-041</b>	MD12-040-2	SWAS1	laranja	si	si	si
<b>PTM-042</b>	MD12-055-1	SWAP1	laranja	si	si	si
<b>PTM-044</b>	MD12-349-1	SWAP1	preta	si	si	si
<b>PTM-046</b>	MD12-545-1	SWAP1	castanha, esporos cinza, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-047</b>	MD12-189-1	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-048*</b>	MD12-461-1-A-1	A1S2	branca	-	-	-
<b>PTM-049</b>	MD12-481-1	SWAS2	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-050</b>	MD12-103-2	SWAS2	amarelo	si	si	si
<b>PTM-054</b>	MD12-262-1	SWAP1	laranja	si	si	si
<b>PTM-055</b>	MD12-056-1	SWAS1	laranja	si	si	si
<b>PTM-056</b>	MD12-525-1-A	1/2A1S2	castanha, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-060</b>	MD12-322-1	1/2A1S2	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-062</b>	MD12-397-3-A	SWAP1	laranja escuro	si	si	si
<b>PTM-063</b>	MD12-505-1	SWAS2	bege, esporos cinza	si	si	19,66
<b>PTM-064</b>	MD12-170-1	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	8,01
<b>PTM-065</b>	MD12-117-1-A	SWAP1	bege, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-067</b>	MD12-009-1	SWAS1	rosa	si	si	si
<b>PTM-069</b>	MD12-151-1	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-071</b>	MD12-080-1-A-1	SWAP1	laranja, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-072</b>	MD12-114-1	SWAS2	preta	si	si	si
<b>PTM-073</b>	MD12-060-3	SWAS1	laranja, esporos pretos, meio rosa	si	si	si
<b>PTM-074</b>	MD12-163-1	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-075</b>	MD12-513-1-A	A1S2	bege, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-077</b>	MD12-397-1-B	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-078</b>	MD12-270-2	1/2A1S2	laranja	si	si	si
<b>PTM-079</b>	MD12-391-2-A	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-080</b>	MD12-505-3-B	A1P1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-081</b>	MD12-003-1	SWAS1	castanha, esporos brancos, meio castanho/amarelo	7,8x10 <sup>-3</sup>	7,8x10 <sup>-3</sup>	si
<b>PTM-083</b>	MD12-358-1-A	SWAP1	bege, esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-084</b>	MD12-364-2	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-085</b>	MD12-603-1	A1P1	bege, esporos brancos, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-088</b>	MD12-364-3	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-089</b>	MD12-332-4-A	1/2A1S2	laranja/salmão	si	si	si
<b>PTM-091</b>	MD12-364-1	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si



<b>PTM-093</b>	MD12-344-1	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-094</b>	MD12-399-2-A	SWAP1	laranja	si	si	si
<b>PTM-095</b>	MD12-399-1	SWAP1	laranja	si	si	si
<b>PTM-096</b>	MD12-638-2	SWAS2	preta	si	si	si
<b>PTM-097</b>	MD12-614-2	A1P1	laranja	si	si	si
<b>PTM-098</b>	MD12-623-2	SWAP1	laranja	-	-	-
<b>PTM-099</b>	MD12-653-2-A	SWAP1	laranja, meio de cultura escurecido	$1,6 \times 10^{-2}$	si	4,94
<b>PTM-100</b>	MD12-308-2	SWAP1	laranja, esporos pretos	-	-	-
<b>PTM-101</b>	MD12-302-2	SWAS2	laranja	si	si	si
<b>PTM-103</b>	MD12-010-1	SWAP1	castanha, esporos brancos, meio muito castanho	si	si	si
<b>PTM-105</b>	MD12-344-2	SWAP1	castanha	$3,1 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-1}$	10,76
<b>PTM-107</b>	MD12-491-2	SWAP1	laranja, esporos pretos, meio rosa	si	si	si
<b>PTM-108</b>	MD12-078-2	SWAS1	laranja	si	si	si
<b>PTM-109</b>	MD12-100-1-A	SWAP1	preta, meio rosa escuro	si	si	si
<b>PTM-112</b>	MD12-077-2	A1P1	bege, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-113</b>	MD12-270-1-A	1/2A1S2	laranja	si	si	si
<b>PTM-114</b>	MD12-141-1	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-115</b>	MD12-561-1	A1P1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-116</b>	MD12-053-1	A1P1	castanha, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-117</b>	MD12-332-1	1/2A1S2	laranja	si	si	si
<b>PTM-118</b>	MD12-031-2	SWAP1	bege/castanho, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-119</b>	MD12-150-1-A	1/2A1S2	castanha, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-121</b>	MD12-001-1-B	SWAS1	esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-122</b>	MD12-483-1	SWAP1	bege, esporos brancos, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-123</b>	MD12-031-3	SWAP1	bege/castanho, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-124</b>	MD12-505-1	A1S1	bege, esporos cinza/brancos	si	si	si
<b>PTM-125</b>	MD12-548-2	SWAP1	bege, esporos cinza, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-126</b>	MD12-533-1	A1P1	castanha, esporos cinza/brancos, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-127</b>	MD12-433-1	A1S2	castanha, esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-128</b>	MD12-123-2	SWAP1	laranja, esporos pretos	$7,8 \times 10^{-3}$	$7,8 \times 10^{-3}$	si
<b>PTM-129</b>	MD12-092-1	SWAP1	preta	si	si	si
<b>PTM-130</b>	MD12-140-1	SWAS2	esporos beges	si	si	si
<b>PTM-131</b>	MD12-132-1	SWAS2	laranja, esporos pretos, meio rosa	si	si	si
<b>PTM-133</b>	MD12-523-2-A	A1P1	esporos cinza escuros	si	si	si
<b>PTM-135</b>	MD12-568-2	SWAP1	esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-136</b>	MD12-076-1-A-1	A1P1	bege, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-137</b>	MD12-397-1-A	SWAP1	esporos cinza (compacto)	si	si	si
<b>PTM-142</b>	MD12-284-1-A	SWAP1	bege, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-146</b>	MD12-178-2	SWAP1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-147</b>	MD12-270-1-A	A1P1	bege, esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-153</b>	MD12-549-2	SWAP1	esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-154</b>	MD12-081-1	SWAP1	bege, esporos cinza	si	si	si

<b>PTM-160</b>	MD12-270-1-A	SWAP1	laranja	si	si	si
<b>PTM-161</b>	MD12-397-4	SWAS2	laranja	si	si	si
<b>PTM-162</b>	MD12-163-1	A1P1	bege, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-163</b>	MD12-177-1	SWAP1	preta	si	si	si
<b>PTM-164</b>	MD12-438-1	SWAS2	laranja	si	si	si
<b>PTM-166</b>	MD12-114-2	SWAP1	preta	si	si	si
<b>PTM-181</b>	MD12-070-1	A1S1	bege/roxa, esporos brancos	-	-	-
<b>PTM-182</b>	MD12-081-2	SWAP1	bege, esporos beges	si	si	si
<b>PTM-184</b>	MD12-434-1-A-1	A1P1	castanha, esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-187</b>	MD12-137-1	SWAS2	laranja escuro	si	si	si
<b>PTM-195</b>	MD12-065-1-A	SWAS1	laranja	si	si	si
<b>PTM-196</b>	MD12-610-1	SWAS2	bege	si	si	si
<b>PTM-207</b>	MD12-535-1-A	SWAS2	bege	si	si	si
<b>PTM-213</b>	MD12-078-1	SWAS1	castanha	si	si	si
<b>PTM-222</b>	MD12-133-2-A	SWAP1	esporos castanho escuro	si	si	si
<b>PTM-238</b>	MD12-053-1	SWAP1	esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-241</b>	MD12-533-2-A-1	A1P1	castanha, esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-247</b>	MD12-544-1	SWAP1	bege/alaranja, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-264</b>	MD12-075-1-A	SWAP1	esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-283</b>	MD12-085-1	SWAS1	laranja	si	si	si
<b>PTM-288</b>	MD12-434-1-A	SWAS2	laranja, esporos pretos, meio amarelo	si	si	si
<b>PTM-300</b>	MD12-107-1-A-1	A1P1	amarela, esporos cinza	si	si	si
<b>PTM-301</b>	MD12-392-2-A	SWAP1	vermelha, esporos brancos	si	si	si
<b>PTM-309</b>	MD12-394-1-A-1	A1P1	bege, esporos cinza, meio rosa	si	si	si
<b>PTM-311</b>	MD12-578-1	1/2A1S2	preta, meio rosa escuro	-	-	-
<b>PTM-321</b>	MD12-239-1	A1P1	laranja, esporos pretos	si	si	si
<b>PTM-324</b>	MD12-503-3	SWAP1	amarelo	si	si	si
<b>PTM-325</b>	MD12-539-1	SWAP1	bege	si	si	si